

UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2 SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2

Discipline: Nutrition-Santé

École Doctorale: Sciences des Procédés-Sciences des Aliments

présentée et soutenue publiquement par

Émilie BONY

Le 13 décembre 2010

**Composition chimique et propriétés anti-inflammatoires
de l'huile de pulpe d'awara (*Astrocaryum vulgare* M.)**

JURY

Pr M.C. BLADÉ	Professeur, Université Rovira i Virgili, Tarragone	Rapporteur
Dr M.J. AMIOT-CARLIN	Directeur de Recherche INRA, Marseille	Rapporteur
Pr J.C. TEULADE	Professeur, Université d'Auvergne, Clermont 1	Président
Dr F. BOUDARD	Maître de Conférences, Université Montpellier 1	Examineur
Pr A. MICHEL	Professeur, Université Montpellier 1	Directeur de thèse
Dr P. BRAT	Ingénieur de recherche CIRAD, Montpellier	Co-directeur de thèse

UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2 SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2

Discipline: Nutrition-Santé

École Doctorale: Sciences des Procédés-Sciences des Aliments

présentée et soutenue publiquement par

Émilie BONY

Le 13 décembre 2010

**Composition chimique et propriétés anti-inflammatoires
de l'huile de pulpe d'awara (*Astrocaryum vulgare* M.)**

JURY

Pr M.C. BLADÉ	Professeur, Université Rovira i Virgili, Tarragone	Rapporteur
Dr M.J. AMIOT-CARLIN	Directeur de Recherche INRA, Marseille	Rapporteur
Pr J.C. TEULADE	Professeur, Université d'Auvergne, Clermont 1	Président
Dr F. BOUDARD	Maître de Conférences, Université Montpellier 1	Examineur
Pr A. MICHEL	Professeur, Université Montpellier 1	Directeur de thèse
Dr P. BRAT	Ingénieur de recherche CIRAD, Montpellier	Co-directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie Monsieur Jean-Claude Teulade, Professeur de l'Université d'Auvergne Clermont 1, pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse, ainsi que Madame Marie-Josèphe Amiot-Carlin, Directeur de Recherche à l'INRA de Marseille et Madame Maria Cinta Bladé, Professeur de l'Université "Rovira i Virgili" de Tarragone, qui ont accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Leurs remarques et suggestions lors de la lecture de mon manuscrit m'ont permis d'apporter des améliorations à la qualité de ce dernier.

Je remercie Monsieur Alain Michel, Professeur de l'Université Montpellier 1, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse, ainsi que Monsieur Pierre Brat, Ingénieur de Recherche CIRAD de Montpellier, pour avoir co-dirigé ces travaux.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Frédéric Boudard, Maître de Conférence de l'Université Montpellier 1, pour avoir participé à ce jury de thèse, mais surtout pour son implication et sa présence tout au long de ces trois années. Son soutien s'est avéré déterminant pour mener à bout cette thèse.

Je remercie Monsieur Jean Giaimis, Professeur de l'Université Montpellier 1, pour sa gentillesse et son accueil chaleureux au sein de son laboratoire d'Immunologie; ainsi que Monsieur Max Reynes, Directeur de l'UMR Qualisud, pour m'avoir permis de réaliser une partie de mes travaux au sein de son laboratoire.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Emilie Dussossoy pour ces deux premières années de thèse passées en sa compagnie, une étroite collaboration qui a laissé place à une grande amitié.

Je remercie Karine Portet pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide technique durant les derniers mois de cette thèse; ainsi que Patrick Poucheret pour les discussions scientifiques et les divers conseils qu'il a su m'apporter.

Je tiens également à remercier Georges Piombo et Nathalie Barouh de l'UMR IATE, ainsi que Yves Pelissier, Professeur de l'Université Montpellier 1, pour leurs aides, leurs grandes disponibilités et leurs conseils scientifiques.

Mes remerciements vont aussi à l'équipe du CIRAD et plus particulièrement à Pascaline, Renaud, Christian, Gilles, Marc et Guy avec qui j'ai pu partager de bons moments à la pause café. Je n'oublie pas Marie-Pierre que je remercie pour son énergie et son efficacité. Je remercie tout particulièrement Jocelyne pour son soutien dans les moments difficiles, mais surtout pour ses conseils "experts" sur divers sujets... et aussi pour nos très bon moments "sportifs", du canyoning au squash, en passant par la fondue bourguignonne.

Je remercie également tout les thésards qui ont croisé ma route, et avec qui j'ai passé de très bons moments. Je pense à Emma et Matthieu, mes collègues de bureau, ainsi qu'à Marie pour sa bonne humeur permanente et les meilleurs souvenirs de ma fin de thèse. Je remercie également Amélie, Nadia, Ricardo, Joseph, Ameziane et Isa. Merci également à Marlène, Tonio, Karim, Ol, Christelle et Nitha, ainsi qu'aux "raclette masters" pour nos multiples soirées montpelliéraines et à mes amis de longue date Laura, Kasia, Marc et Wil.

Je remercie infiniment Nils pour sa présence et son soutien pendant ces trois longues années. Je remercie mes parents, mes frères, Pierre et Romain, et mes beau-parents, pour leur amour, leur soutien et encouragements durant toutes ces années d'études. Merci Pierre pour ton aide artistique pour ma présentation orale! Et je n'oublie pas de remercier Pathy pour la ron-ron thérapie!

Table des Matières

Index des Figures.....	11
Index des Tableaux.....	12
Liste des Publications et Communications.....	13
Liste des Abréviations.....	14
INTRODUCTION.....	17
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	23
Chapitre 1. Présentation d'<i>Astrocaryum vulgare</i> Martius.....	25
I. Généralités sur la famille des Arecaceae.....	26
I.1. Botanique.....	27
I.1.1. Appareil végétatif.....	27
I.1.2. Appareil reproducteur.....	27
I.2. Intérêts.....	28
II. Généralités sur <i>Astrocaryum vulgare</i> Martius.....	28
II.1. Caractères botaniques.....	29
II.2. Distribution, culture et production.....	31
II.3. Utilisations traditionnelles.....	32
II.3.1. Usages industriels.....	32
II.3.2. Utilisations alimentaires et thérapeutiques.....	32
II.4. Études pharmacologiques.....	33
Chapitre 2. L'inflammation.....	35
I. La réaction inflammatoire.....	37
I.1. L'initiation : réaction vasculo-exsudative.....	37
I.2. La réaction cellulaire.....	38
II. Les cellules de l'inflammation.....	39
II.1. Les cellules phagocytaires.....	39
II.2. Les lymphocytes.....	40
II.3. Les mastocytes, polynucléaires basophiles et éosinophiles.....	40
II.4. Les fibroblastes.....	41
II.5. Les cellules endothéliales.....	41
II.6. Les plaquettes.....	41
III. Les médiateurs de l'inflammation.....	42
III.1. Les amines vaso-actives.....	42
III.2. Les médiateurs lipidiques.....	42
III.2.1. Les dérivés de l'acide arachidonique.....	43
III.2.2. Le facteur d'activation plaquettaire (PAF).....	45
III.3. Les cytokines.....	45
III.4. Les molécules d'adhérence.....	46
III.5. Les systèmes d'activation plasmatiques.....	46
III.5.1. Le système des kinines.....	46

III.5.2. Le système du complément.....	46
III.5.3. Le système coagulation fibrino-formation/fibrinolyse.....	46
III.6. Les enzymes lysosomiaux.....	47
IV. Les anti-inflammatoires.....	47
IV.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens.....	47
IV.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	48
Chapitre 3. Le stress oxydant.....	51
I. Les radicaux libres et leurs cibles.....	53
I.1. Les radicaux libres.....	53
I.2. Les cibles des ERO et ERN.....	54
I.2.1. Les lipides.....	54
I.2.2. Les protéines.....	55
I.2.3. L'ADN.....	55
II. Les systèmes antioxydants présents dans l'organisme.....	55
II.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques.....	56
II.1.1. Les superoxydes dismutases.....	56
II.1.2. La catalase.....	56
II.1.3. Les glutathions peroxydases.....	56
II.1.4. La thiorédoxine.....	57
II.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques.....	57
II.2.1. Les systèmes antioxydants non enzymatiques endogènes.....	57
II.2.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques exogènes.....	58
III. Le monoxyde d'azote.....	59
IV. La capacité antioxydante.....	60
IV.1. Les méthodes HAT.....	61
IV.2. Les méthodes SET.....	61
Chapitre 4. Les modèles d'études de l'inflammation.....	63
I. Du macrophage activé au choc septique.....	64
I.1. L'activation du macrophage.....	64
I.2. Le choc septique.....	67
I.2.1. Définition du choc septique.....	67
I.2.2. Physiopathologie du choc septique.....	68
II. L'œdème : un modèle d'inflammation aiguë.....	72
III. L'asthme : un modèle d'inflammation chronique.....	73
III.1. Généralités sur l'asthme.....	73
III.2. Physiopathologie de l'asthme.....	74
III.2.1. L'inflammation bronchique.....	75
III.2.2. Les conséquences fonctionnelles et cliniques.....	78
III.2.3. Le stress oxydant dans l'asthme.....	80
III.3. Les traitements de l'asthme.....	83
Chapitre 5. Phytochimie d'<i>Astrocaryum vulgare</i> M.....	85
I. La pulpe d'awara.....	86

II. L'huile de pulpe d'awara.....	86
II.1. Généralités sur les huiles végétales.....	86
II.2. Caractéristiques de l'huile de pulpe d'awara.....	89
III. La fraction insaponifiable de l'huile de pulpe d'awara.....	90
III.1. Généralités sur la fraction insaponifiable des huiles végétales.....	90
III.2. Les caroténoïdes.....	91
III.2.1. Structure et classification.....	91
III.2.2. Propriétés biologiques.....	93
III.2.3. Composition en caroténoïdes de l'huile de pulpe d'awara.....	97
III.3. Les phytostérols.....	97
III.3.1. Structure et classification.....	97
III.3.2. Propriétés biologiques.....	100
III.3.3. Composition en phytostérols de l'huile de pulpe d'awara.....	104
III.4. Les tocophérols et tocotriénols.....	105
III.4.1. Structure et classification.....	105
III.4.2. Propriétés biologiques.....	105
III.4.3. Composition en tocophérols de l'huile de pulpe d'awara.....	108
TRAVAUX DE LA THESE.....	109
Matériels et Méthodes.....	111
I. Le matériel végétal.....	112
II. Préparation des échantillons.....	112
II.1. Extraction de l'huile de pulpe.....	112
II.2. Obtention de l'extrait insaponifiable brut d'huile de pulpe	112
II.3. Obtention de la fraction insaponifiable	113
III. Analyses chimiques.....	114
III.1. Détermination de la composition en acides gras de l'huile.....	114
III.1.1. Préparation des esters méthyliques.....	114
III.1.2. Analyse des esters méthyliques par CG.....	114
III.2. Détermination de l'acidité de l'huile.....	115
III.3. Détermination de l'indice de peroxyde de l'huile.....	115
III.4. Dosage des tocophérols.....	115
III.5. Dosage des caroténoïdes totaux	116
III.6. Identification et dosage des caroténoïdes par CLHP-DAD-SM.....	116
III.7. Identification et dosage des phytostérols par CG-SM.....	117
IV. Étude des propriétés antioxydantes.....	118
IV.1. Méthode du DPPH <i>in vitro</i>	118
IV.2. Méthode du SNP <i>in vitro</i>	118
V. Étude des propriétés anti-inflammatoires <i>in vitro</i>	119
V.1. Mesure de l'activité des COX.....	119
V.2. Activités <i>in vitro</i> sur une lignée de macrophages murins.....	120
V.2.1. Lignée cellulaire.....	120
V.2.2. Mesure de la viabilité cellulaire.....	120
V.2.3. Traitements et activation des cellules.....	121

V.2.4. Dosage des nitrites.....	121
V.2.5. Dosage des PGE ₂ , du TNF α , de l'IL-6 et de l'IL-10.....	121
V.2.6. Analyse en Western-blot de l'expression de l'iNOS et de la COX-2.....	121
VI. Étude des propriétés anti-inflammatoires <i>in vivo</i>	122
VI.1. Modèle d'inflammation aiguë chez le rat : œdème à la carragénine.....	122
VI.2. Modèle d'inflammation aiguë chez la souris : choc endotoxique au LPS.....	123
VI.2.1. Traitements.....	123
VI.2.2. Prélèvements.....	124
VI.2.3. Dosage des protéines.....	124
VI.2.4. Dosage des cytokines.....	125
VI.2.5. Mesure de la capacité antioxydante du sérum.....	125
VI.3. Modèle d'inflammation bronchique chez le rat sensibilisé.....	125
VI.3.1. Modèle animal.....	125
VI.3.2. Sensibilisation et traitement.....	126
VI.3.3. Évaluation de l'inflammation.....	126
VII. Statistiques.....	128
Résultats et Discussion.....	129
I. Composition chimique, propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes de l'huile de pulpe d'awara.....	130
I.1. Caractéristiques physico-chimiques du fruit et de l'huile de pulpe d'awara.....	130
I.2. Effets de l'huile de pulpe d'awara et de l'extrait insaponifiable dans l'œdème à la patte induit par la carragénine.....	131
I.2.1. Effet de l'huile de pulpe d'awara.....	131
I.2.2. Effet de l'extrait insaponifiable.....	132
I.3. Publication n°1.....	134
I.4. Conclusion.....	158
II. Composition chimique et propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes de la fraction insaponifiable.....	161
II.1. Préparation de la fraction insaponifiable.....	161
II.1.1. Solubilisation de l'extrait insaponifiable.....	161
II.1.2. Capacité de piégeage du radical DPPH.....	162
II.2. Comparaison de la composition chimique de l'extrait et de la fraction insaponifiable.....	162
II.2.1. Comparaison de la teneur en tocophérols.....	162
II.2.2. Comparaison de la teneur en caroténoïdes.....	163
II.2.3. Comparaison de la teneur en phytostérols.....	165
II.3. Essais préliminaires en culture cellulaire.....	167
II.3.1. Effet de la fraction insaponifiable sur la viabilité cellulaire.....	167
II.3.2. Effet de la fraction insaponifiable sur des macrophages J774 non activés.....	168
II.3.3. Détermination des conditions de prétraitement en culture cellulaire.....	169
II.4. Publication n°2.....	170
II.5. Conclusion.....	200
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	203
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	209
ANNEXES.....	227

Index des Figures

Figure 1 : <i>Astrocaryum vulgare</i> M. (d'après Poixblanc, 2001).....	30
Figure 2 : Le fruit d' <i>Astrocaryum vulgare</i> M. : l'awara.....	30
Figure 3 : Coupes du fruit d' <i>Astrocaryum vulgare</i> M.....	31
Figure 4 : Causes, réponses physiologiques et conséquences pathologiques de l'inflammation (d'après Medzhitov, 2008).....	36
Figure 5 : Différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs, principales sous-populations, cytokines majeures produites et fonctions immunitaires principales (d'après DeFranco et al., 2009).....	40
Figure 6 : Voies métaboliques des différents médiateurs lipidiques (d'après Shimizu, 2009).....	43
Figure 7: Mécanisme d'action des stéroïdes (d'après Janeway et al., 2009).....	48
Figure 8 : Les radicaux libres et leurs cibles (d'après Favier, 2003).....	54
Figure 9 : Voies de signalisation de l'IFN γ (d'après Schroder et al., 2006).....	65
Figure 10 : Mécanisme de reconnaissance du LPS et de transduction du signal (d'après Aderem et Ulevitch, 2000).....	66
Figure 11 : Les différentes étapes de l'infection au choc septique (d'après Tsiotou et al., 2005).....	67
Figure 12 : Rôle des macrophages et neutrophiles dans le choc septique (d'après Tsiotou et al., 2005).....	69
Figure 13 : Cinétique de production des cytokines durant les premières étapes du choc septique.....	71
(d'après López-Bojórquez et al., 2004).....	71
Figure 14 : Implications des différents types cellulaires dans les phases précoce et tardive des mécanismes physiopathologiques de l'asthme (d'après Corrigan, 2008).....	76
Figure 15 : Structure du phytoène.....	92
Figure 16 : Structures des principaux caroténoïdes.....	92
Figure 17 : Mécanisme proposé de modulation du système immunitaire des macrophages par le β -carotène (d'après Imamura et al., 2006).....	96
Figure 18 : Structure en C30 du squalène.....	97
Figure 19 : Structures générales des différents phytostérols.....	98
Figure 20 : Structure du 2,3-époxy-squalène.....	98
Figure 21 : Structures des principaux alcools triterpéniques.....	99
Figure 22 : Structures des principaux 4-méthylstérols.....	99
Figure 23 : Structures des principaux stérols.....	100
Figure 24 : Structures des tocophérols et tocotriénols.....	105
Figure 25 : La réaction de saponification appliquée à la synthèse de savon.....	113
Figure 26 : Effet de l'huile de pulpe d'awara sur l'œdème à la patte induit par la carragénine.....	132
Figure 27 : Effet de l'extrait insaponifiable sur l'œdème à la patte induit par la carragénine.....	133
Figure 28 : Structures des différents caroténoïdes identifiés.....	164
Figure 29 : Structures des différents phytostérols identifiés.....	166
Figure 30 : Effet de la fraction insaponifiable sur la viabilité cellulaire des macrophages J774.....	168
Figure 31 : Effet de la fraction insaponifiable sur la production de nitrites sur des macrophages J774 non activés.....	169
Figure 32 : Effet de la fraction insaponifiable avec ou sans prétraitement de 4h sur la production de nitrites à 24 et 48h sur des macrophages J774 activés au LPS/IFN γ	170

Index des Figures Publication n°1

Figure 1: Effect of awara pulp oil on serum cytokine productions and antioxidant capacity in LPS-induced endotoxic shock in mice.	149
Figure 2: Effect of awara pulp oil on total cells (A), leukocyte sub-populations (B), BALF (C) and serum (D) antioxidant capacity, BALF total proteins (E), and BALF EPO activity (F) in BALF of ovalbumin-sensitized rats.....	153

Index des Figures Publication n°2

Figure 1: In vitro effect of EUF and indomethacin on COX-1 and COX-2 activities.....	186
Figure 2: Effect of EUF on nitrites production and iNOS expression by LPS/IFN γ -activated J774 macrophages.....	187
Figure 3: Effect of EUF on PGE2 production and COX-2 expression by LPS/IFN γ -activated J774 macrophages.....	188
Figure 4: Effect of EUF on TNF α (A), IL-6 (B), and IL-10 (C) production by LPS/IFN γ -activated J774 macrophages.....	189
Figure 5: Effects of EUF on serum cytokine production and antioxidant capacity by LPS-induced endotoxic shock in mice.....	190

Index des Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques de la pulpe d'awara.....	86
Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile de pulpe d'awara.....	89
Tableau 3 : Composition en acides gras principaux de l'huile de pulpe d'awara.....	90
Tableau 4 : Composition en stérols de l'huile de pulpe d'awara (Bereau, 2001 ; Chaik, 2003 ; Lubrano et al., 1994).....	104
Tableau 5 : Composition en alcools triterpéniques de l'huile de pulpe d'awara (Chaik, 2003).....	104
Tableau 6 : Choc au LPS : Traitements des différents lots.....	124
Tableau 7 : Caractéristiques physico-chimiques du fruit et de l'huile de pulpe d'awara.....	131
Tableau 8 : Comparaison de la teneur en tocophérols de l'huile, de l'extrait et de la fraction insaponifiable.....	162
Tableau 9 : Comparaison de la teneur en caroténoïdes totaux de l'huile, de l'extrait et de la fraction insaponifiable.....	163
Tableau 10 : Quantification des caroténoïdes de l'extrait et de la fraction insaponifiable obtenus par CLHP-DAD-SM.....	165
Tableau 11 : Quantification des phytostérols de l'extrait et de la fraction insaponifiable obtenus par CG-SM.....	167

Index des Tableaux Publication n°1

Table 1: Fatty acid identification and quantification of awara pulp oil determined by GC-MS.....	145
Table 2: Carotenoid identification and quantification of awara pulp oil determined by HPLC-DAD-MS of the unsaponifiable extract.....	147
Table 3: Phytosterol identification and quantification of awara pulp oil determined by GC-MS of the unsaponifiable extract.....	148
Table 4: Effect of awara pulp oil treatment on cytokine production in different tissues in LPS-induced endotoxic shock in mice.....	150

Index des Tableaux Publication n°2

Table 1: Carotenoid identification and quantification of EUF determined by HPLC-DAD-MS.....	184
Table 2: Phytosterol identification and quantification of EUF determined by GC-MS.....	185
Table 3: Effect of EUF on cytokine production in different tissues in LPS-induced endotoxic shock in mice.....	191

Liste des Publications et Communications

Les résultats de ce travail vont être publiés sous forme d'article :

- ✕ Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil: Chemical Characterization, and Anti-inflammatory Properties in a mice model of endotoxic shock and a rat model of pulmonary inflammation. Emilie Bony, Frédéric Boudard, Pierre Brat, Emilie Dussossoy, Karine Portet, Jean Giaimis, Alain Michel (soumis dans Food Chemistry le 18 octobre 2010).
- ✕ Chemical composition and anti-inflammatory properties of an unsaponifiable fraction from awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil in activated J774 macrophages and in a mice model of septic shock. Emilie Bony, Emilie Dussossoy, Karine Portet, Pierre Brat, Jean Giaimis, Alain Michel, Frédéric Boudard (en préparation).

Ils ont fait l'objet d'une communication orale :

- ✕ Chemical composition and immunomodulatory activities of an unsaponifiable fraction of awara pulp oil (*Astrocaryum vulgare* M.). Bony E., Dussossoy E., Boudard F., Giaimis J., Barouh N., Piombo G., Pallet D., Brat P., Michel A. 3rd International symposium on Human Health Effects of Fruits and Vegetables. Avignon, Octobre 2009.

Ils ont été présentés sous forme d'affiche :

- ✕ Activités immunomodulatrices d'un extrait insaponifiable d'huile de pulpe d'Awara (*Astrocaryum vulgare* M., Arecaceae). Bony E., Dussossoy E., Boudard F., Giaimis J., Pallet D., Brat P., Michel A. 11^{ème} Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales, avril 2009, Grasse.
- ✕ Propriétés anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara (*Astrocaryum vulgare* M., Arecaceae) dans un modèle de rat asthmatiforme. Bony E., Calas C., Dussossoy E., Pallet D., Brat P., Michel A. 12^{ème} Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales, mars 2010, Grasse.

Liste des Abréviations

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride	GSSG	Glutathion oxydé
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6- sulfonate)	HAT	<i>Hydrogen Atom Transfert</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique	HETE	Hydroxyeicosatétranoïque
AFNOR	Association Française de Normalisation	HPETE	Hydroperoxyeicosatétranoïque
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien	IFN	Interféron
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique	Ig	Immunoglobuline
AP-1	<i>Activator Protein- 1</i>	IκB	<i>Inhibitor kappa B</i>
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>	IL	Interleukine
BAL	<i>Bronchoalveolar Lavage</i>	iNOS	Oxyde Nitrique Synthétase inductible
BALF	<i>Bronchoalveolar Lavage Fluid</i>	IP	Intra-péritonéale
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	IRAK	<i>Interleukin- 1 Receptor Associated Kinase</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>	IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
CG	Chromatographie Gazeuse	ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
CIVD	Coagulation Intravasculaire Disséminée	JAK	Janus Kinase
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance	LBP	<i>Lipopolysaccharide- Binding Protein</i>
cNOS	Oxyde Nitrique Synthétase constitutive	LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
COX	Cyclooxygénase	LOX	Lipooxygénase
DAD	<i>Diode Array Detector</i>	LPS	Lipopolysaccharide
DMSO	Diméthylsulphoxyde	LT	<i>Leucotriène</i>
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle	MAMP	<i>Microbial Associated Molecular Pattern</i>
ECP	<i>Eosinophil Cationic Protein</i>	MBP	<i>Major Protein Basic</i>
EIA	<i>Enzyme- Immunoassay</i>	MCP	<i>Membrane Cofactor Protein</i>
ELISA	<i>Enzyme- Labeled Immunosorbent Assay</i>	MIP	<i>Membrane Interface Probe</i>
eNOS	Oxyde Nitrique Synthétase endothéliale	MTBE	Méthyl tert-butyl éther
EPO	<i>Eosinophil Peroxydase Protein</i>	MTS	3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-5-(3- carboxymethoxyphenyl)-2-(4- sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène	MyD	<i>Myeloid Differentiation primary response gene</i>
ERN	Espèces Réactives de l'Azote	NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
Fl	Fluorescéine	NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>	NANC	Ni-Adrénérrique Ni-Cholinergique
GCS	Glutamylcystéine Synthétase	NF	Norme Française
GM-CSF	<i>Granulocyte- Macrophage Colony- Stimulating Factor</i>	NF-κB	<i>Nuclear Factor- kappa B</i>
GSH	Glutathion réduit		

NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>	SM	Spectrométrie de Masse
NK	<i>Natural Killer</i>	SNP	Sodium nitroprusside
nNOS	<i>Oxyde Nitrique Synthétase neuronale</i>	SOD	Superoxyde dismutase
NOS	<i>Oxyde Nitrique Synthétase</i>	STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Nrf2	<i>Nuclear Factor-E2-related factor 2</i>	TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
OMS	<i>Organisation Mondiale de la Santé</i>	TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxydant Capacity</i>
OPD	<i>O-Phenyl-Diamine</i>	Th1	Lymphocytes T helper de type 1
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>	Th2	Lymphocytes T helper de type 2
PAF	<i>Platelet-Activating Factor</i>	THF	Tétrahydrofurane
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	TIR	<i>Toll Interleukine 1 Receptor</i>
PG	<i>Prostaglandine</i>	TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
PI3-kinase	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>	TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
PLA ₂	<i>Phospholipase A₂</i>	TPA	Tétradécanoylphorbol acétate
PMS	<i>Phénazine méthosulfate</i>	TRAP	<i>Total Reactive Antioxidant Potential</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>	Trx	Thiorédoxine
PVDF	<i>Polyvinylidène Fluoride</i>	TrxR	Thiorédoxine Réductase
SC ₅₀	<i>Scavenging Capacity 50%</i>	TxA ₂	Thromboxane A ₂
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>	UV	<i>Ultra-Violet</i>
sem	<i>Standard error of mean</i>	UVH	<i>Ultra-Violet Hemolysis</i>
SET	<i>Single Electron Transfert</i>	VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>	VO	Voie Orale

INTRODUCTION

Introduction

De nombreuses études épidémiologiques ont démontré qu'un régime alimentaire riche en fruits et légumes pouvait prévenir le développement de nombreuses pathologies associées à un stress oxydant et/ou à une inflammation chronique comme l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose ou encore le cancer. En effet, les fruits et légumes sont une importante source de composés antioxydants et/ou anti-inflammatoires tels que les caroténoïdes, les phytostérols, les polyphénols et les tocophérols.

Les huiles végétales jouent un rôle essentiel dans notre alimentation, les lipides étant une importante source d'énergie pour notre organisme. La composition en acides gras varie en fonction de l'origine des lipides et l'excès d'acides gras saturés a été associé au développement de nombreuses pathologies cardiovasculaires et inflammatoires. A l'inverse, une carence en lipides peut entraîner différentes pathologies car les huiles végétales, comme l'huile d'olive ou l'huile de palme, sont une importante source de micronutriments et de vitamines liposolubles (A, E). En effet, l'huile d'olive, composante essentielle du régime méditerranéen, est considérée comme bénéfique pour la santé non seulement par sa forte teneur en acide oléique mais aussi par la présence de microconstituants tels que les polyphénols (tyrosol, hydrotyrosol), les phytostérols (érythrodiol, uvaol, β -sitostérol), les tocophérols et le squalène. L'huile de palme issue du palmier africain *Elaeis guineensis*, longtemps critiquée pour sa forte teneur en acides gras saturés, s'est avérée néanmoins bénéfique pour la santé de par sa richesse en caroténoïdes et en vitamine E, particulièrement en tocotriénols. La consommation de cette huile doit rester cependant raisonnable.

Selon le Département de l'Agriculture des États-Unis, l'huile de palme est aujourd'hui devenue la première huile végétale consommée dans le monde. En effet, elle représente plus de 30 % des huiles végétales consommées, suivie par les huiles de soja (29 %), de colza (15 %) et de tournesol (8 %). Les palmiers font partie, avec les graminées et les légumineuses, des familles de plantes les plus utilisées de par le monde. Le palmier africain et le cocotier (*Cocos nucifera*) sont les espèces les plus connues de cette famille. Plus spécifiquement, les palmiers endémiques du

bassin amazonien les plus domestiqués sont *Elaies oleifera* pour son huile, et *Bactris gasipaes* et *Euterpe oleracea* pour la production de cœur de palmier. Cependant d'autres espèces de palmiers endémiques du bassin amazonien semblent avoir un fort potentiel au niveau nutritionnel, cosmétique ou encore pharmaceutique.

C'est dans le nord-est de l'Amérique du Sud, et plus précisément au nord du Brésil, en Guyane Française et dans les régions voisines, que l'on retrouve *Astrocaryum vulgare* M., représentant de la famille des palmiers. Son fruit, plus communément appelé awara en Guyane Française ou tucuma au Brésil, possède une image emblématique dans la société guyanaise. La pulpe du fruit est consommée crue ou cuite dans la confection du fameux "bouillon d'awara" qui tient une grande place dans la culture guyanaise, et permet la préparation d'une huile comestible, de jus ou de glaces. De par sa richesse en vitamine A, elle est également utilisée traditionnellement dans le traitement d'affections oculaires ou cutanées. Récemment, trois brevets ont été déposés attribuant des propriétés anti-radicalaires, antioxydantes, anti-inflammatoires ou anti-raideurs rhumatismales à des extraits ou préparations issus de la pulpe d'awara. Cependant il existe très peu de publications scientifiques sur les effets biologiques de ce fruit. L'awara ne fait pas ou peu l'objet d'une exploitation et d'une vente et/ou exportation mais ses utilisations actuelles et potentielles en font une ressource à fort intérêt nutritionnel, cosmétique et pharmaceutique.

Objectifs de la thèse

L'objectif principal de ce travail consiste à mettre en valeur les effets santé de ce fruit par la confirmation scientifique des propriétés biologiques retrouvées dans la pharmacopée traditionnelle de Guyane et dans les différents brevets déposés.

La première partie de ce travail a consisté en l'analyse de la composition chimique et des propriétés biologiques de l'huile de pulpe d'awara. L'analyse de la composition en acides gras, constituants essentiels des triglycérides, et des différents composés mineurs de l'huile (caroténoïdes, phytostérols, tocophérols) a permis de caractériser chimiquement l'huile de pulpe d'awara. Puis l'étude des propriétés anti-inflammatoires de cette huile a été réalisée dans deux modèles *in vivo* d'inflammation aigüe et chronique.

Afin de relier les effets anti-inflammatoires observés aux différents constituants mineurs de l'huile de pulpe d'awara, nous avons dans une deuxième partie, étudié les propriétés biologiques de la fraction insaponifiable. Cette fraction a tout d'abord été caractérisée chimiquement pour ses différents constituants. Nous avons, par la suite, évalué ses propriétés anti-inflammatoires dans un modèle *in vitro*, puis dans un modèle *in vivo* d'inflammation aigüe.

La mise en évidence des effets santé et plus précisément des effets antioxydants et anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara et de sa fraction insaponifiable permettra à plus long terme d'envisager une culture et une production à plus grande échelle de ce palmier dans le but de valoriser les agroressources du bassin amazonien.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Présentation d'*Astrocaryum vulgare* Martius

I Généralités sur la famille des Arecaceae

La famille des palmiers (Arecaceae, Arécacées ou Palmae) est particulièrement importante puisqu'elle regroupe près de 2 500 espèces réparties en plus de 200 genres, dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes, de l'Afrique aux Amériques jusqu'à l'Asie (De Granville, 1989). Plante à la fois primitive et très évoluée, le palmier peut s'adapter à des conditions climatiques très diversifiées. Sensibles au gel, ils ne dépassent pas la latitude de 50° nord ou sud. Seules deux espèces (*Phoenix theophrasti*, le dattier de Crète, et *Chamaerops humilis*, le palmier nain ou palmier doum) sont spontanées en Europe.

Occupant une place à part dans le monde végétal, ils comptent parmi les plus anciennes espèces de plantes puisqu'ils existent depuis plus de 80 millions d'années. Ils font partie intégrante de l'écosystème tropical. Un grand nombre d'espèces poussent dans les forêts pluvieuses tropicales, au niveau de la canopée et dans la strate arborescente inférieure. Les palmiers poussent également dans des endroits durablement humides, comme les marais, à proximité des mangroves et sur les rives des fleuves. Ils prospèrent également dans les forêts semi-arides et arides de plaines. On les rencontre encore à 4 000 mètres d'altitude dans la cordillère des Andes, ou dans les oasis, notamment au Sahara.

D'un point de vue botanique, les palmiers sont des monocotylédones et ne sont donc pas des arbres mais des "herbes géantes" qui peuvent aller jusqu'à 40 à 60 m de haut pour le Ceroxylon des Andes, et jusqu'à un mètre de diamètre pour le cocotier du Chili (*Jubaea chilensis*).

I.1 Botanique

I.1.1 Appareil végétatif

C'est une famille de plantes généralement arborescente parfois à l'aspect de lianes ou d'arbustes, à bois atypique n'ayant pas de cambium pour assurer une croissance en largeur du tronc (Judd *et al.*, 2001). Le port paraît être ligneux, mais l'anatomie est différente de celle d'un arbre :

- Il n'y a pas de formation secondaire.
- Le nombre de faisceaux criblo-vasculaires est multiplié.
- On observe une intense lignification du sclérenchyme ce qui leur confère une structure très dure.

Le tronc porte le nom de stipe, et est rempli de moelle. Sa croissance provient de la chute des palmes laissant une écaille ligneuse qui perdure toute la vie de la plante. Les palmes ou feuilles, qui sont en perpétuel renouvellement, avec un entre-nœud court, poussent en bouquet à partir du méristème terminal. Selon les espèces, ces feuilles peuvent avoir la forme d'un éventail (feuilles palmées), d'une plume (feuilles pennées) ou d'une structure intermédiaire (feuilles costapalmées).

I.1.2 Appareil reproducteur

L'inflorescence caractéristique est le spadice qui se développe toujours très lentement. Certains palmiers ont des fleurs qui se développent régulièrement sous le bouquet de feuilles, d'autres palmiers ne fleurissent qu'une fois dans leur vie. L'inflorescence se développe au niveau de la partie terminale, par différenciation du méristème. L'axe de l'épi est parfois très lignifié comme dans le cas de la datte ; ce spadice possède une bractée à la base, la spathe qui est très développée et joue le rôle d'un cornet protecteur. Les fleurs sont petites, régulières en épi, avec des bractéoles à la base. Elles sont unisexuées, étagées et monoïques, avec souvent en haut les fleurs mâles et en bas les fleurs femelles. La trimérie domine, avec 2 cercles de 3 pièces au niveau du périanthe indifférencié, c'est-à-dire 6 tépales et 2×3 étamines ou 3 carpelles. Les pièces florales sont, soit soudées, soit libres. Les trois carpelles ne contiennent qu'un seul ovule chacun. Le développement de l'un des ovules inhibera la fécondation et le développement des ovules des deux autres carpelles. L'anémophilie est relativement fréquente comme mode de dissémination

chez les palmiers. Le fruit est une baie charnue (ex. la datte) ou une drupe, et certains fruits ont un aspect sec.

I.2 Intérêts

Les palmiers sont des plantes parmi les plus utiles dans l'économie agricole des zones tropicales où ils ne sont dépassés en importance que par les graminées et les légumineuses. Toutes les parties de la plante sont employées de manière très variée.

- Usage alimentaire : dattes (genre Phoenix), noix de coco, sucre, vin de palme, coprah (huile très saturée, stable et donc peu chère pour la préparation de margarines), sagou (fécule extrait de la moelle de certains palmiers et qui est riche en amidon), choux palmiste (cœur de palmier), huile de palme.
- Usage thérapeutique : L'Areca fournit la noix d'Arec, qui entre dans de nombreuses pharmacopées indigènes car elle est riche en tanin, en polysaccharide et contient un alcaloïde anthelminthique. Les baies de Serenoa sont utilisées industriellement pour lutter contre l'adénome prostatique. Le sang-dragon est une substance résineuse de couleur rouge foncé qui recouvre les fruits de certains palmiers. Il est principalement utilisé comme pigment mais fait aussi partie de la pharmacopée traditionnelle chinoise dans le traitement de la douleur, des blessures et des contusions.
- Usage industriel : Différentes parties du palmier sont utilisées au niveau industriel. Les fibres dérivées des feuilles ou du stipe sont utilisées dans l'industrie textile (raphia, rônier, crin végétal) ou dans la confection de mobilier, le rotin est une fibre issue du stipe du genre *Calamus*. Les feuilles permettent l'obtention d'une cire et d'une huile utilisée en tant que biodiesel. Le bois est également utilisé pour la réalisation des toitures et planchers.
- Usage ornemental : Les palmiers sont très utilisés au niveau ornemental dans les parcs et jardins, certaines espèces sont également utilisées en tant que plantes d'appartement (kentia).

II Généralités sur *Astrocaryum vulgare* Martius

Classification scientifique :

- Règne : Plantae

- Division : Magnoliophyta
- Classe : Liliopsida
- Ordre : Arecales
- Famille : Arecaceae (Palmae)
- Genre : *Astrocaryum*
- Espèce : *A. vulgare* Martius

Synonymes :

- *Astrocaryum awarra* De Vriese
- *Astrocaryum guianense* Splitgerber ex Martius
- *Astrocaryum segregatum* Drupe
- *Astrocaryum tucumoides* Drupe

Noms vernaculaires :

- Awara : créole
- Tucumâ : portugais

Il ne faut pas confondre *Astrocaryum vulgare* avec *Astrocaryum tucuma* Martius (synonymes : *Astrocaryum aculeatum* G.F.W. Meyer, *Astrocaryum aureum* A.H.R. Grisebach). *Astrocaryum tucuma* est un palmier solitaire aux fruits larges alors qu'*Astrocaryum vulgare* se présente sous la forme de cluster. Le fruit d'*Astrocaryum tucuma* a un mésocarpe orange comme *Astrocaryum vulgare*, cependant son épicarpe est de couleur vert à jaune (Kahn, 2008).

II.1 Caractères botaniques

Chaque pied d'awara est composé de plusieurs stipes terminés par une couronne de feuilles dressées de forme pennée (10 à 16 feuilles) qui le fait ressembler à un plumeau géant (Figure 1).



Figure 1 : *Astrocaryum vulgare* M. (d'après Poixblanc, 2001)

Le stipe mesure de 5 à 15 m de hauteur et de 20 à 30 cm de diamètre. Il porte des épines noires et aplaties, qui peuvent atteindre 12 cm de long. C'est pourquoi les fruits sont ramassés une fois tombés au sol afin d'éviter de se blesser. Chaque feuille ou palme est constituée de folioles irrégulièrement groupées le long du rachis et insérées avec un angle variable. La face inférieure de ces folioles est blanchâtre pulvérulente. Les inflorescences sont abritées par la spathe interne coriace, épineuse, aiguë et longue de 1,5 m ou plus. La floraison intervient d'octobre à décembre et la fructification de janvier à juin. L'awara produit quatre grappes de fruits par an en moyenne.



Figure 2 : Le fruit d'*Astrocaryum vulgare* M. : l'awara

Chaque infrutescence porte entre 100 à 200 fruits serrés les uns contre les autres. Les fruits sont rouge orangé à maturité et de forme ovoïde (45 × 35 mm), la forme et la taille des fruits pouvant légèrement varier d'un palmier à l'autre (Figure 2). Le fruit est constitué de l'épicarpe (ou peau), du mésocarpe (ou pulpe), et d'un endocarpe (ou noyau) très dur contenant une amande de couleur blanche (Figure 3). L'acumen correspond au reste de la fleur femelle avant qu'elle ne se transforme en fruit (Gazel, 2002).

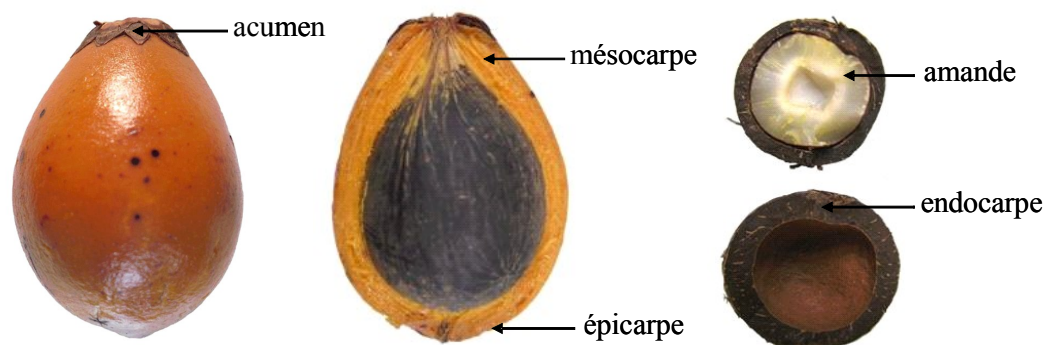


Figure 3 : Coupes du fruit d'*Astrocaryum vulgare* M.

II.2 Distribution, culture et production

L'awara semble originaire du nord-ouest de l'Amérique du Sud. Il a été très anciennement cultivé par les Amérindiens et sans doute introduit en Guyane. On le retrouve aujourd'hui principalement au Brésil, en Guyane, au Pérou et au Venezuela. L'awara est un palmier épineux qui pousse sur les terres basses, dans les sols argileux ou sableux bien drainés, le long du littoral guyanais (De Granville, 1989). Il a donné son nom à la région d'Awala, commune amérindienne située à la pointe Nord Ouest de la Guyane. La présence de l'awara dans un site éloigné de la côte témoigne généralement d'un ancien village disparu. Ce palmier se reproduit par drageon ou par germination des graines enfouies par les agoutis, animaux sauvages qui en sont très friands (Poixblanc, 2001).

L'awara possède une image emblématique dans la société guyanaise mais ne fait pas ou peu l'objet d'une exploitation et d'une vente et/ou exportation malgré ses utilisations actuelles et potentielles. En effet, des produits à base d'awara auraient une forte valeur ajoutée à la fois dans des utilisations alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Cependant la récolte constitue une difficulté car les palmiers sont dispersés et épineux.

II.3 Utilisations traditionnelles

L'awara est un palmier qui tient une place importante dans la culture et les traditions guyanaises, car chacun des éléments qui le composent peut se révéler utile dans la vie quotidienne (De Granville, 1989 ; Kahn, 2008).

II.3.1 Usages industriels

Le stipe peut servir de combustible, les feuilles servent à fabriquer des balais ou de la vannerie. Enfin, le bois d'awara, noir, dur et durable, est utilisé dans la construction des villages amérindiens ou boni. L'huile de pulpe est également utilisée pour la préparation de savons, ainsi que de biodiesel.

II.3.2 Utilisations alimentaires et thérapeutiques

Le bourgeon terminal appelé "chou" est consommé en salade, plus connu sous le nom de cœur de palmier. Par incision des spadices avant la floraison, on recueille une sève sucrée qui donne par fermentation le vin de palme. Les racines sont utilisées en décoction contre les crises de furonculose et auraient des propriétés dépuratives (Grenand *et al.*, 1987 ; De Granville, 1989).

L'huile d'amande ou tchô-tchô (appelé aussi Kio-Kio ou Tyo-tyo) est une huile adoucissante utilisée dans la médecine traditionnelle créole et Bushi-nengé pour soigner plusieurs maux : furoncles, piqûres d'insectes, rhumatismes, maux de dents. C'est aussi un vermifuge pouvant servir de purgatif lorsqu'il est associé à l'huile de ricin ou d'olive. En friction, elle aurait des propriétés anti-rhumatismales et relaxantes, et favoriserait la transpiration (De Granville, 1989). Pour sa préparation, on commence par récolter les fruits desséchés au pied de l'awara plusieurs mois après qu'ils soient tombés. L'amande est extraite de la graine avec précaution, car il est important de ne pas la briser. Les amandes sont mises à tremper dans de l'eau durant plusieurs jours ce qui libère une forte odeur plutôt désagréable. Elles sont ensuite cuites à feu doux et l'huile qui s'en exsude au cours de la cuisson est récupérée. Cette huile appelée tchô-tchô se gélifie à température ambiante, il est donc nécessaire de la faire réchauffer avant utilisation. On dit que préparée à l'aurore, à la pleine lune ou un jour de forte marée, la production de tchô-tchô présente un rendement supérieur. La teneur importante en stérols dans la fraction insaponifiable de l'huile d'amande expliquerait les vertus relaxantes et anti-rhumatismales de cette préparation, les stérols présentant des activités anti-inflammatoires et réparatrices des dommages cutanés.

La pulpe du fruit est considérée comme hautement nutritive par sa teneur en provitamine A, en vitamines B et C et par sa haute valeur calorique (Cavalcante, 1977). Elle peut être consommée crue ou cuite dans la confection du fameux "bouillon d'awara" qui tient une grande place dans la culture guyanaise (De Granville, 1989). On peut également retirer de la pulpe une huile comestible et préparer également des jus, des glaces, des confitures ou des liqueurs. De par sa richesse en vitamine A, l'awara est utilisé contre les problèmes oculaires et la xérophtalmie, maladie provoquant des troubles visuels et une hypersensibilité à la lumière ainsi que des lésions épithéliales dont l'insuffisance en vitamine A est la principale cause. L'huile de pulpe est également utilisée traditionnellement dans le traitement de certaines maladies de la peau (Sosnowska et Balslev, 2009) ; on la retrouve aujourd'hui commercialisée (entre 17 et 18,90 euros les 30 ml) en tant que cosmétique pour ses propriétés anti-radicalaire et anti-vieillessement.

Le bouillon d'awara est un plat traditionnel de la gastronomie guyanaise, qui se consomme entre Pâques et la Pentecôte. La composition du plat est très riche : elle associe choux vert et blanc, concombres longs et piquants, épinards pays, haricots pays, aubergines, viandes de porc, de bœuf, de poulet, ainsi que du poisson boucané et des crevettes. Les ingrédients sont liés par la pâte d'awara qui est un jus épais préparé avec le jus des fruits du palmier. D'après le légendaire dicton guyanais, « le voyageur qui consomme le bouillon d'awara tombe à jamais amoureux de la Guyane et s'il n'y reste pas définitivement, il reviendra un jour ou l'autre en Guyane ».

II.4 Études pharmacologiques

Une étude de screening des activités anti-tyrosinase de plusieurs plantes n'a pas montré d'activité importante pour un extrait issu du fruit d'awara (Baurin *et al.*, 2002). La tyrosinase, largement distribuée dans la nature, est une enzyme impliquée dans la synthèse de la mélanine, c'est une enzyme cible dans le traitement des maladies associées à la pigmentation. Un screening de différents extraits de plantes sur l'activité inhibitrice de la PLA₂ a montré une inhibition de 30 % pour un extrait issu du fruit de l'awara, la PLA₂ étant une enzyme clé de l'inflammation (Bernard *et al.*, 2001).

En 2000, un premier brevet a été déposé, par Pauly G. sur l'« Usage d'extraits de plantes à activité anti-radicalaire » parmi lesquels figure l'awara (Pauly et Moretti, 2000). En 2003, une thèse a été réalisée sur l'« activité anti-inflammatoire des composés insaponifiables d'*Astrocaryum vulgare* » par Asma Chaik (Chaik, 2003). L'auteur a montré dans l'œdème à la patte induit par la carragénine que la fraction insaponifiable de l'huile de pulpe d'awara avait une activité

anti-inflammatoire à la fois par administration orale et intra-péritonéale alors que l'huile de pulpe avait une faible activité. Cependant, ces résultats n'ont pas fait l'objet de publications scientifiques. Suite à ces travaux, deux brevets ont été déposés en 2004, par Benjelloun-Mlayah B. sur les « Extraits de fruits d'*Astrocaryum vulgare* et préparations obtenues à caractère anti-inflammatoire » (Benjelloun-Mlayah *et al.*, 2004) et en 2006, par Bonnafous C. sur les « Propriétés antioxydantes, anti-radicalaires et anti-raideurs rhumatismales des huiles et du tourteau d'*Astrocaryum vulgare* » (Bonnafous *et al.*, 2006).

Chapitre 2. L'inflammation

L'inflammation est un mécanisme de défense normal qui protège l'organisme des infections et autres agressions. Ce mécanisme de défense initie la destruction des agents pathogènes, les processus de réparation tissulaire et de restauration de l'homéostasie au niveau des sites infectés ou endommagés (Figure 4) (Medzhitov, 2008). Quelque soit l'étiologie, l'ensemble des modifications tissulaires, vasculaires et humorales successives à des lésions cellulaires ou tissulaires, comprend :

- Des phénomènes généraux, qui sont exprimés cliniquement de façon variable, le plus souvent par de la fièvre, et localement par des symptômes de rougeur, chaleur et tuméfaction.
- Des phénomènes locaux qui se déroulent dans les tissus vascularisés, préférentiellement dans le tissu conjonctif. L'inflammation vise à éliminer l'agent pathogène et à réparer les lésions tissulaires. Cependant, l'inflammation peut être néfaste par persistance de lésions trop importantes ou de la substance pathogène, ou par anomalies des régulations du processus inflammatoire.

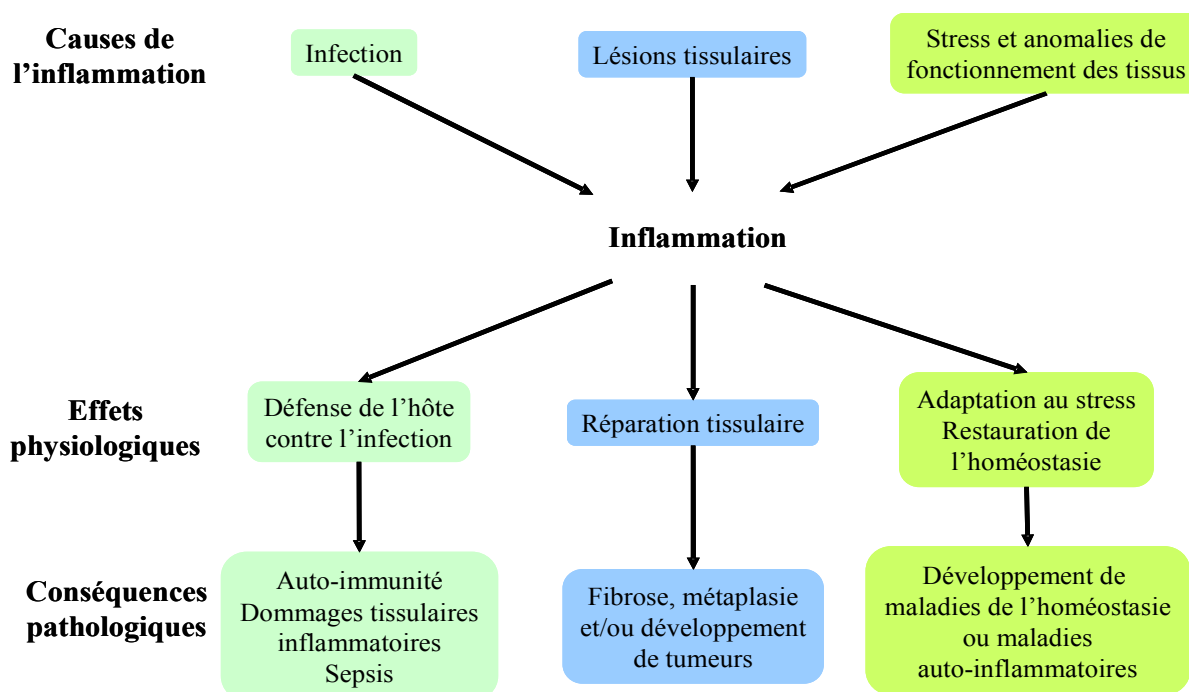


Figure 4 : Causes, réponses physiologiques et conséquences pathologiques de l'inflammation (d'après Medzhitov, 2008)

L'inflammation peut être causée par différentes agressions ou pathologies :

- agents infectieux : bactéries, virus, parasites, champignons ;
- agents physiques : traumatismes, chaleur, froid, radiations ionisantes ;
- agents chimiques : caustiques, toxines, venins ;
- corps étrangers : exogènes ou endogènes ;
- défaut de vascularisation : réaction inflammatoire secondaire à une nécrose par ischémie ;
- anomalie de la réponse immunitaire, allergies, auto-immunité ;
- tumeurs malignes ou bénignes.

I La réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire est un processus dynamique comportant plusieurs étapes successives : la réaction vasculo-exsudative, la réaction cellulaire, la détersion, la phase terminale de réparation et de cicatrisation. Elle fait intervenir les phénomènes d'immunité naturelle ou innée (phagocytose) et spécifique (cellulaire, humorale).

I.1 L'initiation : réaction vasculo-exsudative

Elle se traduit cliniquement par des signes de rougeur, chaleur, tuméfaction et douleur et comporte trois phénomènes :

- La **congestion active** due à une vasodilatation survenant après une brève phase de vasoconstriction qui favorise l'hémostase. Elle est caractérisée par une augmentation du débit sanguin mais un ralentissement circulatoire et se traduit par une accumulation de sang au site inflammatoire. Elle est déterminée par un mécanisme nerveux et un mécanisme chimique impliquant l'histamine, la sérotonine, les kinines et les prostaglandines provenant des mastocytes et des plaquettes.
- L'**œdème inflammatoire** qui, par augmentation de la perméabilité vasculaire, a pour conséquence de diluer le foyer inflammatoire, de limiter ce foyer par une barrière fibrineuse, de concentrer sur place les moyens de défense humoraux (immunoglobulines, complément),

d'apporter des médiateurs chimiques et de ralentir le courant circulatoire par hémocoagulation. Ces différents phénomènes favorisent la diapédèse leucocytaire.

- La **diapédèse leucocytaire** est la traversée active des parois vasculaires par les leucocytes. Elle est favorisée par le ralentissement circulatoire, la turgescence endothéliale et l'afflux leucocytaire.

I.2 La réaction cellulaire

Elle se caractérise par la formation d'un tissu de granulation inflammatoire. La composition du tissu de granulation varie en fonction du temps. L'inflammation aiguë est caractérisée par la présence de polynucléaires neutrophiles, mais l'évolution du tissu de granulation inflammatoire fait apparaître plus de cellules inflammatoires mononucléées (macrophages, lymphocytes, mastocytes et monocytes) que de polynucléaires. Puis progressivement, sous l'influence de facteurs de croissance, le tissu de granulation s'enrichit en fibroblastes et en cellules endothéliales. La composition du tissu de granulation varie aussi en fonction de la cause de l'inflammation : un type cellulaire pouvant prédominer sur un autre.

Le granulome inflammatoire a pour but d'assurer la détersion par les phagocytes, de développer une réaction immunitaire B et/ou T et de sécréter de multiples médiateurs intervenant dans le recrutement cellulaire, la phagocytose, la défense immunitaire, et la modification de la matrice conjonctive. Durant ces phénomènes, des métabolites toxiques et des protéases peuvent être libérés dans l'espace extra-cellulaire, ce qui engendre des lésions tissulaires.

La détersion succède progressivement à la phase vasculo-exsudative, et est contemporaine de la phase cellulaire. La détersion est l'élimination des tissus nécrosés (issus de l'agression initiale ou du processus inflammatoire lui-même), des agents pathogènes et de l'exsudat, soit par phagocytose, soit par des mécanismes spontanés (ex : suppuration). La détersion prépare obligatoirement la phase terminale de réparation-cicatrisation. Si la détersion est incomplète, l'inflammation aiguë va évoluer en inflammation chronique. La réparation tissulaire suit une détersion complète. Elle aboutit soit à une cicatrice soit à une restitution intégrale du tissu. Le processus de réparation implique de nombreux facteurs de croissance et d'interactions complexes entre cellules et matrice extra-cellulaire.

II Les cellules de l'inflammation

Les cellules de l'inflammation comprennent à la fois des cellules sanguines circulantes : polynucléaires neutrophiles, monocytes, polynucléaires éosinophiles, basophiles, plaquettes et lymphocytes ; et des cellules résidentes tissulaires : macrophages, histiocytes, mastocytes, cellules endothéliales, fibroblastes.

II.1 Les cellules phagocytaires

Les cellules phagocytaires comprennent les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques. Elles sont capables de reconnaître des micro-organismes et de les ingérer (DeFranco *et al.*, 2009).

Les polynucléaires neutrophiles qui représentent 60 à 70 % des leucocytes du sang agissent par l'intermédiaire de récepteurs de surface. Les récepteurs chimiotactiques vont générer la migration des polynucléaires neutrophiles vers le site de l'inflammation, la production de radicaux libres oxygénés et l'expression de molécules d'adhésion. Les récepteurs aux opsonines et aux molécules d'adhésion des cellules endothéliales interviennent également. Une fois activés, les polynucléaires neutrophiles synthétisent de nombreux produits agissant soit sur les substances phagocytées, soit dans le milieu extra-cellulaire.

Les macrophages ont un rôle de surveillance immunitaire des tissus. Ils dérivent des monocytes circulants du sang. L'activation des macrophages entraîne la phagocytose qui constitue une composante majeure de la réponse immunitaire innée. L'activation des macrophages entraîne également la sécrétion de nombreux médiateurs inflammatoires. Les macrophages jouent également un rôle dans la réponse immunitaire acquise lorsqu'ils sont activés par des lymphocytes T ou par des anticorps produits par les cellules B.

Les cellules dendritiques sont principalement impliquées dans l'immunité acquise et n'ont pas un rôle de destruction comme les macrophages. Dans les tissus périphériques, elles sont retrouvées sous leur forme immature et ont un rôle de phagocytose. Puis, au niveau des tissus lymphoïdes secondaires, les cellules dendritiques matures ont pour but la présentation de l'antigène aux lymphocytes T (Geissmann *et al.*, 2010).

II.2 Les lymphocytes

Les lymphocytes, cellules de l'immunité spécifique, humorale et cellulaire, sont de type B (CD20), T (CD3) ou NK (*Natural Killer*). La différenciation des lymphocytes B aboutit aux plasmocytes qui sont responsables de la sécrétion des anticorps. Les cellules NK ont une action cytotoxique par reconnaissance et destruction des cellules infectées et de certaines cellules tumorales. Les lymphocytes T sont responsables de la sécrétion de cytokines, certains sont dits cytotoxiques (CD8), d'autres auxiliaires ou « helper » (CD4), encore subdivisés en Th1, Th2, Th17 et T_{REG} (Romagnani, 2006). Les sous-populations de cellules Th ont des fonctions immunitaires différentes en fonction des cytokines produites et activent ou inhibent par conséquence différents types cellulaires (DeFranco *et al.*, 2009) (Figure 5).

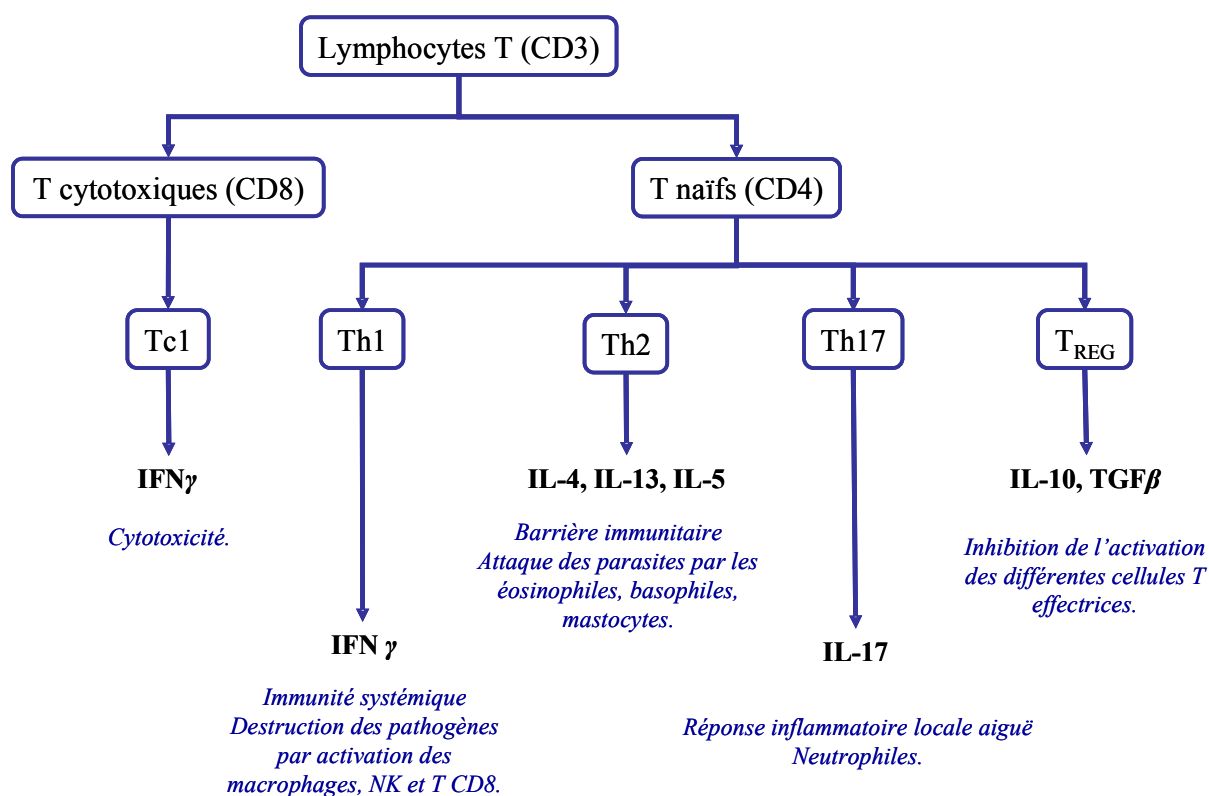


Figure 5 : Différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs, principales sous-populations, cytokines majeures produites et fonctions immunitaires principales (d'après DeFranco *et al.*, 2009)

II.3 Les mastocytes, polynucléaires basophiles et éosinophiles

Les basophiles, mastocytes et éosinophiles jouent un rôle de protection contre les parasites par libération des médiateurs inflammatoires contenus dans leurs granules.

Les mastocytes sont présents dans les tissus périphériques et les polynucléaires basophiles représentent 1 % des leucocytes du sang. Ils comportent des granulations qui contiennent plusieurs médiateurs chimiques impliqués dans l'inflammation et l'allergie tels que l'histamine, la sérotonine et les leucotriènes. Ils possèdent à leur surface des récepteurs de haute affinité pour le fragment constant des Immunoglobulines E (IgE) ce qui entraîne leur dégranulation et la libération des médiateurs de l'inflammation, en présence de leur antigène respectif. Les éosinophiles sont des cellules circulantes qui représentent 3 % des leucocytes du sang. Elles possèdent des granules cytoplasmiques qui libèrent après activation des médiateurs inflammatoires cytotoxiques.

II.4 Les fibroblastes

Les fibroblastes jouent à la fois un rôle dans la réaction inflammatoire par production d'enzymes de destruction de la matrice extra-cellulaire du tissu conjonctif, et un rôle dans la cicatrisation par production des différents constituants de cette même matrice (collagène, fibronectine...).

II.5 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales jouent un rôle important dans le tonus vasculaire, la vasomotricité, la jonction intercellulaire, l'équilibre fibrino-formation/fibrinolyse, la migration des leucocytes et la réparation post-inflammatoire. L'activation des cellules endothéliales va entraîner le déclenchement des cascades des kinines et de la coagulation, en plus des modifications d'adhérence et de perméabilité qui permettent l'afflux de cellules et de protéines au niveau du site inflammatoire.

II.6 Les plaquettes

Les plaquettes participent aux phénomènes de coagulation et de réparation (fibronectine, facteurs de croissance). La dégranulation des plaquettes par agrégation de leurs récepteurs libère des médiateurs pro-inflammatoires (éicosanoïdes, thromboxane...).

III Les médiateurs de l'inflammation

On retrouve un grand nombre de médiateurs chimiques à tous les stades de l'inflammation, dans le plasma sous forme de précurseurs qui acquièrent leurs propriétés après activation (généralement par protéolyse) ainsi que des médiateurs d'origine cellulaire préformés et séquestrés dans des granules intra-cellulaires ou synthétisés suite à un stimulus. La plupart des médiateurs exercent leur action en se fixant aux récepteurs membranaires de cellules cibles. Ils provoquent des réactions en cascade par libération d'autres médiateurs qui peuvent agir eux-mêmes de façon synergique ou antagoniste, entraînant des mécanismes d'amplification ou de résistance à l'action médiatrice initiale (Male *et al.*, 2007).

III.1 Les amines vaso-actives

Les amines vaso-actives (histamine, sérotonine) sont stockées sous la forme de granules cytoplasmiques dans les mastocytes, les polynucléaires basophiles, les plaquettes, et sont libérées lors de la phase vasculo-exsudative. Elles produisent une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire responsable de la congestion active et de l'œdème inflammatoire. L'histamine entraîne également une contraction des fibres musculaires lisses (bronchoconstriction) et une attraction des polynucléaires éosinophiles.

III.2 Les médiateurs lipidiques

Les médiateurs lipidiques sont des dérivés des phospholipides des membranes cellulaires, ils comprennent les métabolites de l'acide arachidonique et le facteur d'activation plaquettaire (Figure 6) (Shimizu, 2009).

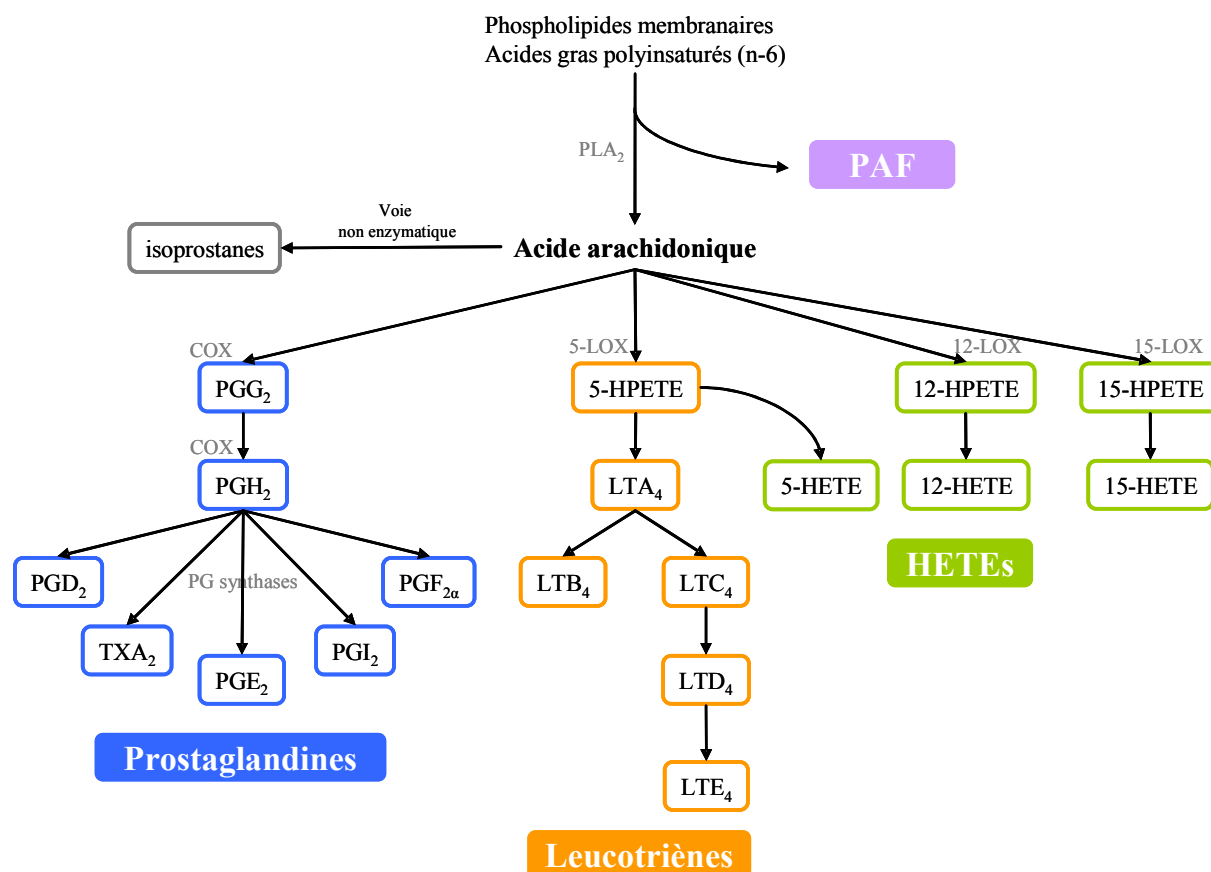


Figure 6 : Voies métaboliques des différents médiateurs lipidiques (d'après Shimizu, 2009)

III.2.1 Les dérivés de l'acide arachidonique

Le métabolisme de l'acide arachidonique est complexe : les métabolites intermédiaires et terminaux ont des effets variables et parfois antagonistes au cours de l'inflammation (Khanapure *et al.*, 2007).

Sous l'action de la phospholipase A₂ (PLA₂), les phospholipides membranaires sont transformés en acide arachidonique qui est ensuite dégradé pour aboutir à la production d'éicosanoïdes : acides gras à 20 atomes de carbone. Il existe deux voies métaboliques principales de l'acide arachidonique : la voie des cyclo-oxygénases (COX) produisant les prostaglandines (PG) et la voie des lipo-oxygénases (LOX) produisant les leucotriènes (LT). Ces substances sont des immunomodulateurs locaux et des médiateurs de l'allergie et de l'inflammation. Le cytochrome P₄₅₀ constitue également une voie métabolique de l'acide arachidonique.

III.2.1.a La voie de la cyclo-oxygénase

Les COX jouent à la fois un rôle d'oxydation et de peroxydation grâce à deux sites catalytiques. Elles transforment l'acide arachidonique en prostaglandine G₂ (PGG₂) qui est réduit en prostaglandine H₂ (PGH₂). Puis, selon les types d'isomérases et de synthases présentes dans la cellule, les PGH₂ sont converties en 5 types de prostanoïdes différents (Figure 6) rapidement libérés par la cellule et qui exercent différentes activités :

- Le thromboxane A₂ (TxA₂) a une action de bronchoconstriction, d'agrégation plaquettaire, de coagulation et d'augmentation de la pression artérielle par vasoconstriction des artérioles.
- La prostacycline (PGI₂) produite par les cellules endothéliales est un antiagrégant plaquettaire, et entraîne une diminution de la pression artérielle en inhibant la vasoconstriction des artérioles par inhibition de la synthèse des TxA₂.
- Les prostaglandines E₂ (PGE₂), F₂α (PGF₂α), D₂ (PGD₂) ont des effets très variables selon le type de prostaglandine, mais entraînent généralement vasodilatation, hyperperméabilité vasculaire, chimiotactisme, douleur, fièvre. Leurs effets sont moins rapides et plus prolongés que ceux de l'histamine. Les PGE₂ sont produites par les monocytes, macrophages et neutrophiles ; elles induisent fièvre et vasodilatation et exercent un pouvoir d'attraction des leucocytes. Les PGF₂α sont produites par les monocytes, macrophages et neutrophiles et induisent une vasoconstriction. Les PGD₂ sont produites par les mastocytes et basophiles et s'opposent à l'inflammation. Elles induisent la contraction des muscles lisses et augmentent la perméabilité capillaire.

On retrouve deux isoformes de la cyclo-oxygénase :

- la COX-1 qui est constitutive et exprimée dans la plupart des tissus ;
- la COX-2 qui est induite lors de l'inflammation par le LPS, le TPA, l'IL-1 ou le TNFα. Elle est retrouvée entre autres dans les cellules endothéliales, les monocytes et macrophages.

III.2.1.b La voie de la lipo-oxygénase

L'acide arachidonique est également dégradé en leucotriènes par les lipo-oxygénases (LOX) qui peuvent être constitutives ou inductibles. Il existe trois LOX : 5-, 12- et 15-LOX qui convertissent respectivement l'acide arachidonique en acides 5-, 12- et 15-hydroperoxy-éicosatétranoïques (HPETE) qui sont ensuite transformés en différents LT ou en

acides hydroxy-éicosatétraoïques (HETE) (Figure 6). Ces médiateurs jouent un rôle de chimiotactisme (LTB_4), de vasoconstriction et bronchoconstriction et augmentent la perméabilité vasculaire (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4). Les leucotriènes sont produits par les neutrophiles, éosinophiles et basophiles mais surtout par les mastocytes et macrophages alvéolaires. Contrairement aux prostaglandines qui ont généralement une action rapide, les leucotriènes ont une action lente et sont considérés comme particulièrement, important dans les pathologies inflammatoires chroniques comme l'asthme (DeFranco *et al.*, 2009).

III.2.2 Le facteur d'activation plaquettaire (PAF)

C'est un médiateur synthétisé à partir des phospholipides membranaires par activation de la PLA_2 , par les polynucléaires neutrophiles et basophiles, les mastocytes, les monocytes-macrophages et les plaquettes (Figure 6). Le PAF agit soit par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques soit par induction d'autres médiateurs et entraîne augmentation de la perméabilité vasculaire, agrégation des plaquettes, stimulation de l'attraction des leucocytes et de leur adhésion à l'endothélium.

III.3 Les cytokines

Les cytokines sont des peptides ou des glycoprotéines produites par de nombreuses cellules, parmi lesquelles les lymphocytes et les monocytes-macrophages. Parmi les cytokines, on retrouve les interleukines (IL), les interférons (IFN), les chimiokines, les facteurs de croissance hématopoïétiques, les *tumor necrosis factor* (TNF) et les facteurs de croissance transformants. Elles agissent, par l'intermédiaire de récepteurs membranaires sur la cellule qui les produit (effet autocrine), sur des cellules proches (effet paracrine), et sur des cellules situées à distance (effet endocrine). Certaines cytokines sont pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et $TNF\alpha$), d'autres sont anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, et IL-13). Le type de la réaction inflammatoire est déterminé par les cytokines sécrétées par les lymphocytes T (Figure 5). Celles qui favorisent l'immunité cellulaire sont dites de type Th1 ; celles de type Th2 orientent vers la sécrétion d'anticorps. Les cytokines ont de nombreux effets dont la médiation de l'immunité naturelle, la régulation de l'activation, de la croissance et de la différenciation des lymphocytes, et la stimulation de l'hématopoïèse.

III.4 Les molécules d'adhérence

Les cellules du foyer inflammatoire sont concentrées à l'endroit précis de l'organisme où l'agression a eu lieu. Ce ciblage est le résultat d'interactions complexes de molécules d'adhérence et de leurs ligands cellulaires, qui, par exemple, augmentent ou diminuent l'adhérence au tissu interstitiel. Les vaisseaux du foyer expriment des molécules d'adhérence pour retenir les cellules sanguines qui portent le ligand correspondant.

III.5 Les systèmes d'activation plasmatiques

III.5.1 Le système des kinines

Les kinines sont des polypeptides dont la formation est déclenchée par de nombreux facteurs. On les retrouve au cours de la phase initiale vasculo-exsudative, leur action est puissante mais brève car leur durée de vie est très courte et se rapproche de l'action de l'histamine : vasodilatation, hyperperméabilité capillaire, adhérence des polynucléaires aux cellules endothéliales, douleur, contraction des muscles lisses. La bradykinine est un médiateur important de la douleur.

III.5.2 Le système du complément

Le système du complément est constitué d'environ 20 protéines plasmatiques (facteurs du complément) s'activant selon des réactions de protéolyse en cascade déclenchées soit par la fixation d'un complexe Antigène-Anticorps, soit par des substances variées (endotoxines, lyse cellulaire, enzymes lysosomiales libérées par les polynucléaires). Les protéines du complément entraînent l'opsonisation des micro-organismes, l'attraction des phagocytes au niveau du foyer inflammatoire, l'augmentation du flux sanguin, la lyse de nombreuses espèces bactériennes et la libération de médiateurs inflammatoires par les mastocytes.

III.5.3 Le système coagulation fibrino-formation/fibrinolyse

Le système de coagulation est en relation complexe avec les phénomènes inflammatoires. L'inflammation active la fibrino-formation et par voie de conséquence la fibrinolyse ce qui contribue à amplifier l'inflammation. La formation de dépôts de fibrine intra et extra-vasculaires au cours de l'inflammation est due à un déséquilibre du système fibrino-formation/fibrinolyse. La

formation de fibrine à partir du fibrinogène plasmatique provient de la formation de thrombine lors du phénomène de coagulation. La fibrinolyse conduit à la formation de plasmine à partir du plasminogène (précurseur plasmatique), c'est la plasmine qui détruit ensuite la fibrine par protéolyse.

III.6 Les enzymes lysosomiaux

Les enzymes lysosomiaux agissent au niveau des vacuoles de phagocytose et interviennent dans la digestion des produits de phagocytose ou sont déversés dans le milieu extra-cellulaire lors de la lyse des polynucléaires.

IV Les anti-inflammatoires

Le but du traitement de l'inflammation est de réduire les effets indésirables comme la douleur sans modifier les effets bénéfiques de réparation. Les anti-inflammatoires ne traiteront pas la cause de la maladie mais ses effets indésirables.

IV.1 Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens, également appelés corticostéroïdes, (prednisone, prednisolone, bêtaméthasone) sont des dérivés synthétiques des corticostéroïdes naturels, hormones sécrétées par les glandes cortico-surrénales. Ce sont des anti-inflammatoires puissants largement utilisés pour supprimer les effets délétères des réponses inflammatoires. Ils agissent à différents niveaux par régulation (activation ou inhibition) de la transcription d'un grand nombre de gènes cibles (Janeway *et al.*, 2009). Ils traversent librement les membranes et se fixent sur un récepteur spécifique appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires aux stéroïdes, libérant des molécules chaperonnes dont Hsp90 (protéine de choc thermique). La formation du complexe glucocorticoïde-récepteur a lieu dans le cytoplasme, puis celui-ci migre vers le noyau pour agir sur la régulation de la transcription de gènes cibles (Figure 7). Les glucocorticoïdes inhibent la production de la PLA₂ et donc la production d'écossanoïdes. Ils inhibent également de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α ...) en agissant sur certains facteurs de transcription nucléaires, en particulier NF- κ B et AP-1. Cependant ils possèdent de nombreux effets indésirables tels que l'altération de la peau, la fragilité osseuse, l'apparition d'un état

diabétique ou d'hypertension artérielle. Les corticostéroïdes améliorent le pronostic vital et fonctionnel de nombreuses maladies mais n'agissent pas sur la cause de la maladie.

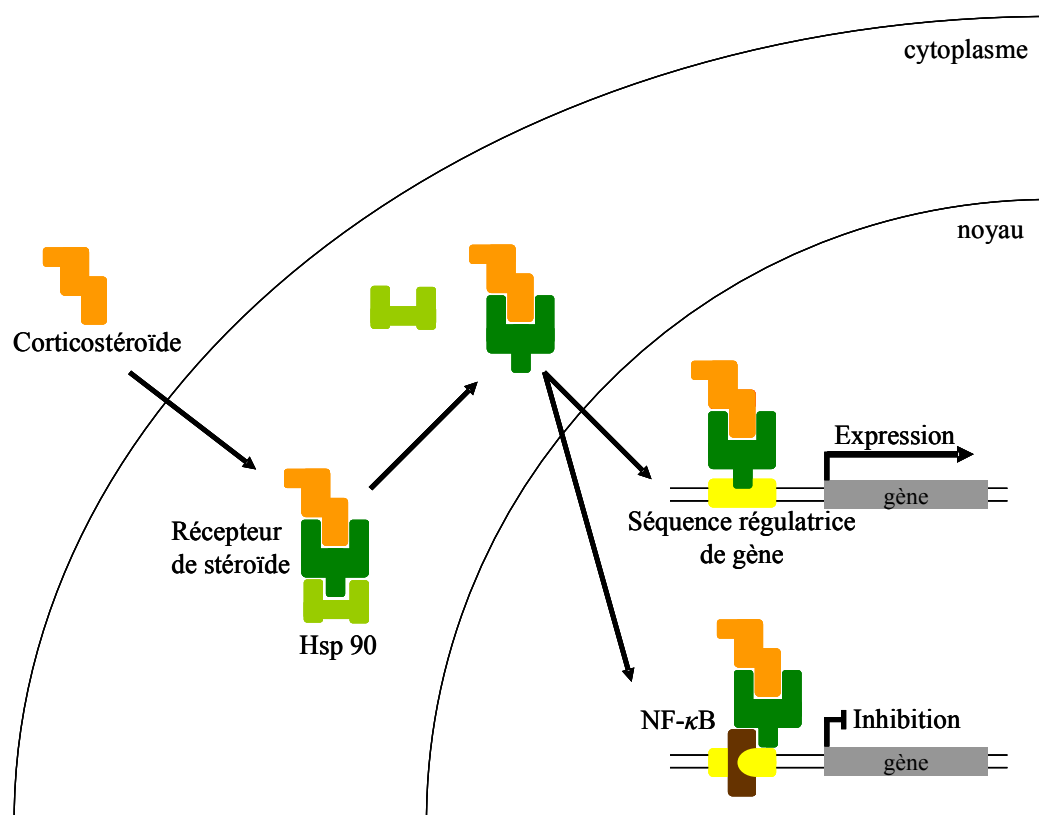


Figure 7: Mécanisme d'action des stéroïdes (d'après Janeway et al., 2009)

IV.2 Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (phénylbutazone, indométacine, diclofénac, ibuprofène, dérivés de l'acide propionique, oxicams) appartiennent à diverses catégories de molécules. Ce sont des inhibiteurs des COX aux propriétés anti-inflammatoires, antalgiques et antipyrétiques (Vonkeman et Van de Laar, 2010). Ils sont principalement utilisés dans les phases aiguës de l'inflammation, en rhumatologie (arthrite, poussée inflammatoire d'une arthrose, tendinite), traumatologie, urologie (coliques néphrétiques) et gynécologie (règles douloureuses).

Leur action inhibitrice des COX-1 et -2 entraîne une diminution de la production de différentes prostaglandines et de thromboxanes. Cette classe thérapeutique présente cependant, par l'inhibition de la COX-1, des effets indésirables : génération d'ulcères gastro-intestinaux (inhibition de la production de PG gastro-protectrices) et diminution de l'agrégation plaquettaire (inhibition de la production de TxA_2). L'aspirine bloque l'activité des COX de façon irréversible,

l'ibuprofène agit par compétition avec l'acide arachidonique ce qui fait de lui un inhibiteur réversible.

Après la découverte des deux isoformes de cyclo-oxygénase, les premiers anti-inflammatoires spécifiques de la COX-2 sont apparus dans les années 1990 avec pour but de réduire les effets indésirables des AINS classiques. Ces inhibiteurs spécifiques (célécoxib, rofécoxib) ont montré une moindre toxicité digestive mais un risque important de complications cardiovasculaires (Solomon *et al.*, 2004). Ces effets indésirables seraient dus à la perte de l'équilibre $\text{TxA}_2/\text{PGI}_2$, car les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 inhiberaient la production de PGI_2 (anti-thrombotique) mais n'agiraient pas sur le TxA_2 (pro-thrombotique) (Rao et Knaus, 2008 ; Vonkeman et Van de Laar, 2010). Ils ont donc été progressivement retirés du marché (rofécoxib) ou sujets à des restrictions d'usage (célécoxib).

Chapitre 3. Le stress oxydant

La production de radicaux libres par l'organisme est un mécanisme maîtrisé par les systèmes antioxydants. Dans des conditions physiologiques, la balance entre la production d'oxydants endogènes et l'apport ou la production d'antioxydants est à l'équilibre, les oxydants endogènes produits à faible dose étant utiles à l'organisme (Valko *et al.*, 2007). En effet, les radicaux libres remplissent de nombreuses fonctions utiles dans l'organisme comme la transduction des signaux, la défense immunitaire, le cycle cellulaire, la phagocytose et l'inflammation. Ils participent aux voies de transduction du signal de plusieurs hormones et facteurs de croissance. Le stress oxydant joue un rôle dans la régulation de l'expression de certains gènes par régulation des facteurs de transcription comme NF- κ B et AP-1 (Kabe *et al.*, 2005), et à un stade plus élevé, un processus d'apoptose peut être déclenché si les capacités de réparation sont dépassées. Les radicaux libres sont nécessaires à l'organisme, on parle donc de balance antioxydants/oxydants. Les voies thérapeutiques doivent donc prendre en compte l'effet bénéfique des radicaux libres, car une élimination totale des radicaux libres pourrait être néfaste.

Lors d'un excès d'oxydants (endogènes ou exogènes) ou un déficit en antioxydants, l'excès de radicaux libres entraîne un état de stress oxydant. Le déficit en antioxydants peut provenir d'une carence alimentaire ou d'anomalies génétiques au niveau des systèmes antioxydants endogènes.

Les sources de radicaux libres endogènes sont variées. On retrouve les radicaux libres formés lors de l'inflammation par la phagocytose et lors de la détoxification. Ils ont une action nécrosante locale, inactivent des anti-protéases, activent la PLA₂. Les radicaux libres endogènes proviennent également de la respiration mitochondriale, de la NADPH oxydase, des peroxysomes, du cytochrome P₄₅₀, de la xanthine oxydase, des cyclo- et lipo-oxygénases. On retrouve aussi des radicaux libres ayant un rôle de médiateurs tissulaires, c'est le cas du NO[•].

Les sources exogènes de radicaux libres sont les toxiques environnementaux (métaux lourds), les radiations ionisantes et UV, les champs électriques, les xénobiotiques pro-oxydants ou encore le tabac et l'alcool.

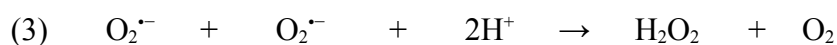
I Les radicaux libres et leurs cibles

I.1 Les radicaux libres

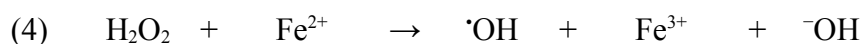
Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres impliqués ont leur électron célibataire sur l'oxygène ou sur l'azote.

Les radicaux primaires sont soit des dérivés de l'oxygène, on parle d'espèces réactives de l'oxygène ou ERO, soit des dérivés de l'azote, on parle d'espèces réactives de l'azote ou ERN (monoxyde d'azote NO[•], peroxy-nitrites ONOO^{•-}). D'autres espèces réactives non radicalaires peuvent entraîner la formation de radicaux (oxygène singulet ¹O₂, peroxyde d'hydrogène H₂O₂). Les radicaux secondaires sont issus de la réaction des radicaux primaires avec les composés biochimiques de la cellule (Delattre, 2007).

Les espèces réactives de l'oxygène sont représentées par le radical superoxyde (O₂^{•-}), le radical perhydroxyle (HO₂[•]), le radical hydroxyle ([•]OH) qui est le plus toxique, le radical peroxyde (RO₂[•]) et le radical alkoxyde (RO[•]) où R est un substrat organique. Elles peuvent être générées en très petite quantité *in vivo* au cours du métabolisme normal de l'oxygène. La chaîne respiratoire mitochondriale entraîne la réduction de 98 % de l'O₂ en H₂O (réaction (1)), la production d'O₂^{•-} représentant 2 % de la réduction de l'O₂ (réaction (2)) :



La réaction (3) est une réaction de dismutation régulée par les superoxydes dismutases (SOD) qui aboutit à la formation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), il n'est pas un radical mais devient toxique lors de la réaction de Fenton (4) par production d'[•]OH et d'⁻OH.



Au cours du stress oxydant, la production accrue de ces espèces radicalaires et moléculaires engendre de nombreuses dégradations oxydatives au niveau des macromolécules biologiques comme l'ADN, les protéines et les lipides (Figure 8). Les lésions qu'elles engendrent, sont

impliquées dans plusieurs pathologies (athérosclérose, cancer, maladies neurodégénératives...), dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion et dans le vieillissement. Ce sont les antioxydants endogènes et exogènes qui limitent les effets des ERO, et donc qui protègent l'organisme contre le stress oxydant.

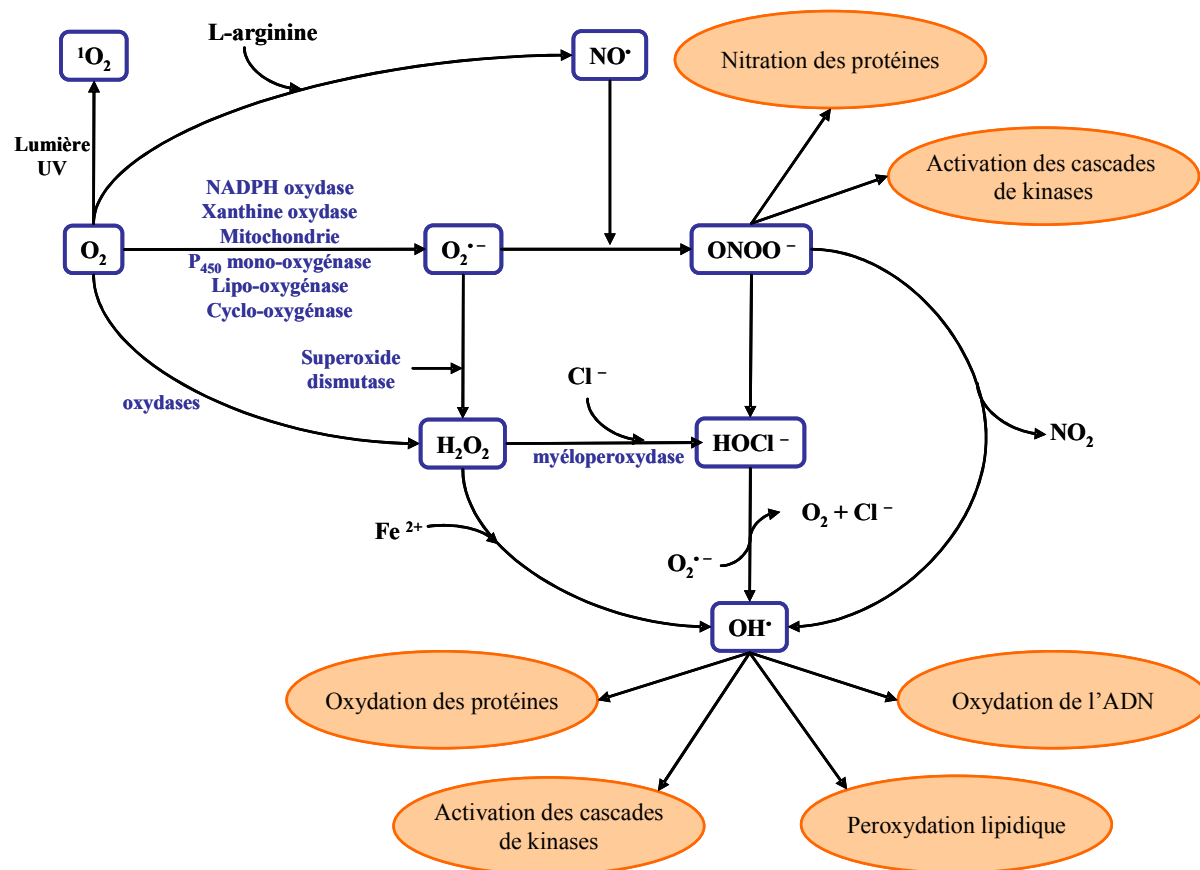


Figure 8 : Les radicaux libres et leurs cibles (d'après Favier, 2003)

I.2 Les cibles des ERO et ERN

I.2.1 Les lipides

Les acides gras poly-insaturés très abondants dans la nature, sont très sensibles à l'oxydation. On parle alors de peroxydation lipidique qui entraîne la production de nombreux produits primaires (hydroperoxydes) ou secondaires (aldéhydes) aux activités multiples. C'est la production en quantité anormale de ces molécules que l'on retrouve dans différentes pathologies chroniques comme l'athérosclérose. Les acides gras poly-insaturés, estérifiés (phospholipides, esters de cholestérol, triglycérides) ou non sont une cible majeure d'attaque radicalaire. Une autre

cible importante est le cholestérol non estérifié qui aboutira à la formation des oxystérols. Parmi les acides gras poly-insaturés, l'acide arachidonique est un substrat majeur pour la formation de médiateurs lipidiques tels que les leucotriènes, les prostaglandines ou encore les isoprostanes (voie non enzymatique) qui sont impliqués dans l'inflammation (Favier, 2003 ; Rubbo et Radi, 2008).

I.2.2 Les protéines

Les dommages créés aux protéines entraînent la perte de leurs fonctions biologiques (Rubbo et Radi, 2008), les dommages retrouvés sont :

- l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés ;
- l'oxydation de la chaîne polypeptidique suivie d'une fragmentation et ou de la formation de liaisons croisées intra ou inter chaînes (ponts dissulfures) ;
- les nitro-tyrosines provenant de l'action des peroxy-nitrites et empêchant les phénomènes de transduction intracellulaire du signal (phosphorylation/déphosphorylation des tyrosines).

I.2.3 L'ADN

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque des radicaux libres. Les dommages oxydatifs principaux sont des modifications des bases puriques et pyrimidiques, des cassures simple et double-brin et des sites abasiques oxydés ou non. Les systèmes de réparation de l'ADN contre-carrent ces phénomènes, mais en cas de stress oxydant élevé ou de défaillance du système de réparation, une mutation ponctuelle peut apparaître pouvant aboutir aux premières étapes de la carcinogénèse ou de l'apoptose de la cellule (Beckman et Ames, 1997).

II Les systèmes antioxydants présents dans l'organisme

Les systèmes antioxydants présents dans l'organisme sont, soit d'origine endogène, soit exogène. On distingue également les antioxydants enzymatiques des antioxydants non enzymatiques. Les antioxydants peuvent être définis comme des substances qui, à faible concentration, diminuent significativement ou inhibent l'oxydation de leur substrat (Niki, 2010). En fonction de leur mécanisme d'action, les antioxydants ont un rôle de prévention, de piégeage,

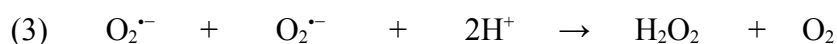
de réparation ou de régénération des antioxydants ainsi que de messenger cellulaire par régulation des antioxydants endogènes.

II.1 Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les systèmes antioxydants enzymatiques sont d'origine endogène. Ces différentes enzymes sont en interrelation dans la régulation du stress oxydant intracellulaire (Matés *et al.*, 1999). En effet, l'action de la SOD conduit à partir de l'ion superoxyde à la formation de peroxyde d'hydrogène qui est lui-même un composé oxydant. C'est donc la catalase et les peroxydases qui devront alors compléter son action.

II.1.1 Les superoxides dismutases

Les SOD entraînent la dismutation de l'anion superoxyde (réaction (3)) :

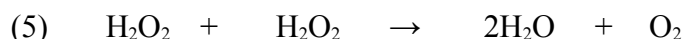


Les SOD sont ubiquitaires chez les eucaryotes et représentent une famille de métalloprotéines où les métaux sont généralement liés à 4 résidus histidine. On distingue différents isoenzymes (Landis et Tower, 2005) :

- la SOD à manganèse qui protège la mitochondrie (MnSOD) ;
- les SOD à cuivre et zinc qui protègent le cytosol (cCu-ZnSOD), les cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD).

II.1.2 La catalase

La catalase entraîne la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (réaction (5)), elle utilise le fer comme co-facteur. Elle est présente dans les peroxysomes et les érythrocytes.



II.1.3 Les glutathions peroxydases

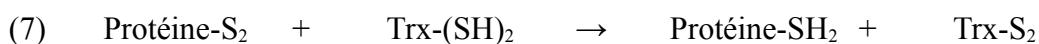
Les glutathions peroxydases à sélénium catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène ou des hydroperoxydes organiques en eau ou en alcool, tandis que le glutathion réduit (GSH) est

transformé en glutathion oxydé (GSSG) (réaction (6)). Chez les eucaryotes, on distingue 5 isoenzymes que l'on retrouve au niveau cytosolique ou mitochondrial. Les hydroperoxydes organiques peuvent être des hydroperoxydes des esters de cholestérol, des phospholipides, des lipoprotéines, et de l'ADN. D'autres peroxydases utilisent le cytochrome c (cytochrome c peroxydases) ou le NADH (NADH peroxydases). Le GSSG retourne à son état réduit GSH sous l'action de la glutathion réductase.



II.1.4 La thiorédoxine

La thiorédoxine (Trx) est un antioxydant majeur ubiquitaire, qui est responsable du maintien des protéines à l'état réduit dans le milieu intracellulaire (réaction (7)) : on retrouvera donc principalement des groupements thiols libres et peu de ponts disulfures. Elle joue également un rôle dans la régénération des vitamines C et E et dans la régulation rédox du facteur de transcription NF- κ B (Hirota *et al.*, 1999). La thiorédoxine oxydée retourne à son état réduit sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) (réaction (8)).



II.2 Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Les molécules antioxydantes non enzymatiques (exogènes ou endogènes) ont pour rôle de subir l'oxydation à la place des macromolécules pour être par la suite soit éliminées, soit régénérées par divers mécanismes.

II.2.1 Les systèmes antioxydants non enzymatiques endogènes

Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques endogènes sont le glutathion, la bilirubine, les hormones sexuelles, l'acide urique, le coenzyme Q, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoïque. Le glutathion, le plus important, est un tripeptide impliqué dans de nombreux processus métaboliques parmi lesquels la communication intercellulaire et la prévention de l'oxydation des groupements thiols. Il joue également un rôle important au niveau cérébral. Il peut

intervenir soit par piégeage d'espèces radicalaires soit par participation à l'activité d'enzymes antioxydantes.

II.2.2 Les systèmes antioxydants non enzymatiques exogènes

Les bienfaits d'une alimentation riche en fruits et légumes sont reconnus et attribués à la teneur en antioxydants qui agit par piégeage des radicaux en captant l'électron célibataire (Balsano et Alisi, 2009). L'apport d'antioxydants non enzymatiques exogènes par notre alimentation diminuerait le risque de survenue de cancers, de maladies cardiovasculaires et dégénératives.

La vitamine E correspond à la famille des tocophérols et tocotriénols. La forme la plus active est l' α -tocophérol. C'est le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme. Il est capable de piéger chimiquement l'oxygène singulet 1O_2 en s'oxydant en quinone, et de réagir avec le radical hydroxyl. Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les ROO^\bullet pour former le radical tocophéryle. L' α -tocophérol est régénéré grâce à la vitamine C et la tocophéryl réductase glutathion dépendante qui sont capables de réduire le radical tocophéryle en α -tocophérol (Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996).

La vitamine C ou acide ascorbique est présente le plus souvent sous sa forme ascorbate. C'est le plus important antioxydant dans les fluides extra-cellulaires. C'est un piègeur très efficace des anions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et peroxydes et de l'oxygène singulet. La vitamine C est régénérée par les ascorbates réductases (Kojo, 2004).

Les caroténoïdes sont représentés par plus de 600 molécules mais seulement une cinquantaine sont des précurseurs de la vitamine A. Ils sont de très puissants anti-radicalaires (oxygène singulet, ROO^\bullet , R^\bullet), et protègent contre la photosensibilisation (El-Agamey *et al.*, 2004).

Le zinc et le sélénium ont un rôle antioxydant indirect en assurant la stabilisation de la Cu-ZnSOD et des glutathion peroxydases. Le zinc possède également d'autres propriétés antioxydantes (inhibition de la réaction de Fenton, de la formation des ponts disulfure intramoléculaire, de la peroxydation lipidique).

Les vitamines B (B2, B3, B9) sont des co-facteurs nécessaires au cycle du glutathion (permet au glutathion oxydé GSSG de retrouver son état initial réduit GSH), à l'activité glutathion réductase, au cycle du NADP, aux réactions d'oxydo-réductions cellulaires.

Les polyphénols sont retrouvés sous forme de dérivés glucosidiques dans de nombreux fruits et légumes ; ils se répartissent en flavonoïdes, acides phénoliques, lignanes et stilbènes qui ont un pouvoir antioxydant important (Urquiaga et Leighton, 2000).

Les sulfures d'allyle sont des composés soufrés de l'ail qui agissent en tant qu'antioxydant par piégeage des ERO et par augmentation de l'activité des SOD, des catalases et des peroxydases.

III Le monoxyde d'azote

Mis en évidence au niveau du système cardiovasculaire, le monoxyde d'azote (NO[•]) provient de l'oxydation de l'arginine par action des NO synthases ou NOS (Alderton *et al.*, 2001) (réaction (9)).



On retrouve 3 isoformes de NO synthases :

- La NOS endothéliale (eNOS) qui est constitutive et impliquée dans la régulation de l'homéostasie vasculaire. Le NO[•] produit active les guanylate cyclases des cellules cibles, le GMPc formé agit comme second messenger sur des kinases, phosphatases et canaux ioniques en favorisant le relâchement des muscles lisses, la vasodilatation, l'inhibition de l'aggrégation plaquettaire, l'adhésion leucocytaire, et en modulant l'activité des mastocytes.
- La NOS neuronale (nNOS) qui est constitutive. Le NO[•] joue le rôle de neurotransmetteur, et joue également un rôle dans la relaxation des muscles lisses du tractus gastro-intestinal, respiratoire et génito-urinaire.
- La NOS inducible (iNOS) qui est induite lors de l'inflammation et génère de grandes quantités de NO[•]. Le NO[•] produit intervient principalement dans la réaction inflammatoire, l'immunité non spécifique et au cours des processus de réparation tissulaire. L'expression de l'iNOS est induite par des produits bactériens tels que le lipopolysaccharide (LPS) ou les cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IFN γ , IL-6 et IL-1 β). Tout facteur susceptible d'activer NF- κ B entraîne l'expression de l'iNOS. (Kleinert *et al.*, 2004)

Le NO[•] est un radical libre qui participe à la plupart des grandes fonctions physiologiques de l'organisme. Il est produit par les macrophages, les cellules endothéliales, et certains neurones

cérébraux et intervient dans le maintien du tonus vasculaire, de la neurotransmission, de la fonction rénale, et dans le système immunitaire non spécifique. Il a des effets protecteurs vis-à-vis du stress oxydant en limitant la peroxydation lipidique et a une activité anti-inflammatoire par limitation du recrutement leucocytaire, et modulation de la toxicité du $\text{TNF}\alpha$, et du LPS. C'est une molécule clé de la signalisation cellulaire (transduction, transcription, respiration mitochondriale) (Coleman, 2001).

Mais dans certaines conditions pathologiques, il exerce une activité pro-inflammatoire qui est due à la surexpression de l'iNOS ce qui lui confère un rôle ambigu. Les pathologies associées à une surproduction de NO^* sont le diabète, les maladies du système nerveux central, les pathologies gastro-intestinales et pulmonaires, les syndromes d'ischémie reperfusion ainsi que l'athérosclérose. Les mécanismes d'action du NO^* sont multiples avec des effets parfois contradictoires. Il module l'action de nombreuses activités enzymatiques (guanylate cyclase, cyclo-oxygénase, NADPH oxydase, cytochrome P_{450}). Il intervient dans le stress oxydant par formation de peroxy-nitrites qui vont endommager les protéines (nitrotyrosine), les lipides et l'ADN. Le NO^* peut aussi se combiner aux radicaux organiques pour former des composés moins puissants. Le NO^* inhibe la respiration mitochondriale et contribue au maintien de l'homéostasie par régulation des processus apoptotiques. Le NO^* joue également un rôle de messenger inter et intracellulaire au niveau de la transduction et de la transcription du signal ($\text{NF-}\kappa\text{B}$, AP-1, p53) (Tripathi, 2007).

IV La capacité antioxydante

Un grand nombre de méthodes de mesure de la capacité antioxydante ont été développées ; cependant il existe une grande variabilité entre les études et donc une corrélation difficile entre les résultats. De par la diversité des espèces réactives et les différents mécanismes oxydatifs intervenant au sein de l'organisme, il est donc difficile de déterminer une seule méthode universelle de mesure de la capacité antioxydante que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Niki, 2010).

La capacité des antioxydants à piéger les radicaux libres a été largement étudiée. Les différentes méthodes d'étude utilisées font intervenir soit une réaction avec un radical libre stable, soit une méthode de compétition, soit une réduction d'ions métalliques. On peut également classer ces méthodes en fonction du type de transfert impliqué : un atome d'hydrogène (HAT : *Hydrogen Atom Transfert*) ou un électron (SET : *Single Electron Transfert*).

IV.1 Les méthodes HAT

Les méthodes HAT consistent la plupart du temps à mesurer la capacité d'un antioxydant (AH) à stabiliser un radical (X') par le transfert d'un atome d'hydrogène. C'est la cinétique de compétition entre un oxydant et un antioxydant envers une sonde moléculaire oxydable qui est suivi, l'antioxydant ayant pour but de protéger la sonde de l'oxydant (Prior *et al.*, 2005).

Parmi les méthodes HAT, on retrouve les méthodes ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) et TRAP (*Total Reactive Antioxidant Potential*) qui sont relativement semblables. La méthode ORAC est une méthode fluorimétrique largement utilisée permettant la mesure de la capacité antioxydante vis-à-vis des radicaux peroxydes mais pas des ERO. La fluorescéine (FI) joue le rôle de sonde, et c'est l'attaque par un radical peroxyde (ROO') qui va entraîner son oxydation et donc la perte de fluorescence. Cette perte de fluorescence suit une cinétique plus ou moins rapide en fonction de la capacité de l'antioxydant présent. On observe donc une compétition au niveau des réactions suivantes, le radical fixant préférentiellement l'atome d'hydrogène labile de l'antioxydant :



IV.2 Les méthodes SET

Les méthodes SET sont basées sur la capacité d'un antioxydant à transférer un électron afin de réduire un oxydant. Le suivi de la réaction rédox se fait généralement par colorimétrie par la différence de couleur de l'oxydant entre son état réduit et oxydé. La capacité antioxydante correspond donc à la capacité de réduction de l'antioxydant.

On retrouve parmi les différentes méthodes SET, les méthodes DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) et FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). La méthode TEAC utilise l'ABTS (2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate)) qui nécessite un radical peroxyde ou un autre oxydant pour donner le radical ABTS^{•+} alors que les deux autres méthodes utilisent directement des radicaux libres stables. La méthode DPPH est une méthode rapide et largement utilisée, cependant la réduction du radical DPPH est suivie en UV-visible ce qui entraîne des interférences de mesure lorsque les antioxydants testés sont colorés et tout particulièrement avec les caroténoïdes (Prior *et al.*, 2005).

Les méthodes HAT sembleraient plus adaptées que les méthodes SET puisque les radicaux peroxy sont les radicaux libres prédominants dans les systèmes biologiques, cependant les autres sources de radicaux ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, RO_2^{\cdot} ...) sont également impliquées dans le stress oxydant.

Chapitre 4. Les modèles d'études de l'inflammation

I Du macrophage activé au choc septique

La réponse immunitaire à un agent pathogène est constituée d'une réponse innée et d'une réponse adaptative. La réponse innée est principalement médiée par les cellules comme les neutrophiles et les macrophages, cellules qui vont phagocyter et détruire l'agent pathogène et produire des médiateurs inflammatoires qui permettront de coordonner la réponse de l'hôte. La présentation par les macrophages des antigènes aux lymphocytes T permettra l'activation de la réponse adaptative. La première difficulté de la réponse innée sera donc la reconnaissance d'un pathogène potentiel par un nombre limité de récepteurs. La régulation fine de cette réponse immunitaire sera également d'une grande importance. En effet, l'activation inappropriée ou prolongée des macrophages est en grande partie responsable des pathologies inflammatoires aiguës (choc septique) et chroniques (arthrite rhumatoïde, asthme...).

I.1 L'activation du macrophage

L'activation des macrophages se fait classiquement par deux signaux. Le premier signal joue un rôle de *priming* pour les macrophages mais ne permet pas l'activation. Le deuxième signal est un inducteur du $\text{TNF}\alpha$ ou le $\text{TNF}\alpha$ lui-même. La voie physiologique classique du deuxième signal est généralement le résultat de l'activation des *toll-like receptors* (TLRs) qui va induire la production endogène de $\text{TNF}\alpha$ par le macrophage lui-même (Mosser, 2003). Le *priming* prépare les macrophages à une future stimulation par altération ou modulation de la réponse inflammatoire induite, le deuxième signal étant nécessaire à l'activation des macrophages et à la libération de médiateurs inflammatoires.

Les macrophages et neutrophiles expriment à leur surface des récepteurs cellulaires appelés *pattern recognition receptors* (PRRs) qui reconnaissent des motifs microbiens connus sous le nom de *microbial associated molecular patterns* (MAMPs). Les MAMPs sont par exemple le lipopolysaccharide (LPS), l'acide lipotéichoïque, les flagellines... La reconnaissance d'un MAMP par un PRR va déclencher une cascade de signaux intracellulaires dans les cellules immunitaires mais aussi dans les cellules épithéliales et endothéliales, engendrant la réponse à l'agent infectieux principalement par la libération de cytokines pro-inflammatoires. Plusieurs MAMPs vont agir de façon synergique, ainsi qu'avec les médiateurs de l'hôte et l'hypoxie. Parmi les PRRs, les TLRs représentent une classe de récepteurs trans-membranaires très conservés, on en dénombre 10 chez

les mammifères. Ils sont caractérisés par un domaine extra-cellulaire spécifique riche en leucine et un domaine intra-cytoplasmique *toll interleukine 1 receptors* (TIR) qui présente une homologie avec le récepteur cytoplasmique à l'IL-1. L'activation des TLRs induit une signalisation similaire par l'activation de facteurs de transcription dont le *Nuclear Factor-Kappa B* (NF- κ B) et l'*Activator Protein 1* (AP-1), les cellules ainsi activées vont alors produire des médiateurs inflammatoires (Aderem et Ulevitch, 2000).

L'IFN γ , cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les lymphocytes T et les cellules NK, est le plus important des signaux de *priming* (Schroder *et al.*, 2006). Il agit par augmentation de la capacité de liaison des TLRs à leur ligand et par augmentation de la transduction du signal des TLRs. Il active également, par l'intermédiaire de son récepteur, les facteurs de transcriptions *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT-1), *Interferon Regulatory Factor-1* (IRF-1) et *Interferon Consensus Sequence-binding protein* (ICSBP) qui vont agir de façon synergique avec les facteurs de transcription induits par les TLRs (NF- κ B) (Figure 9).

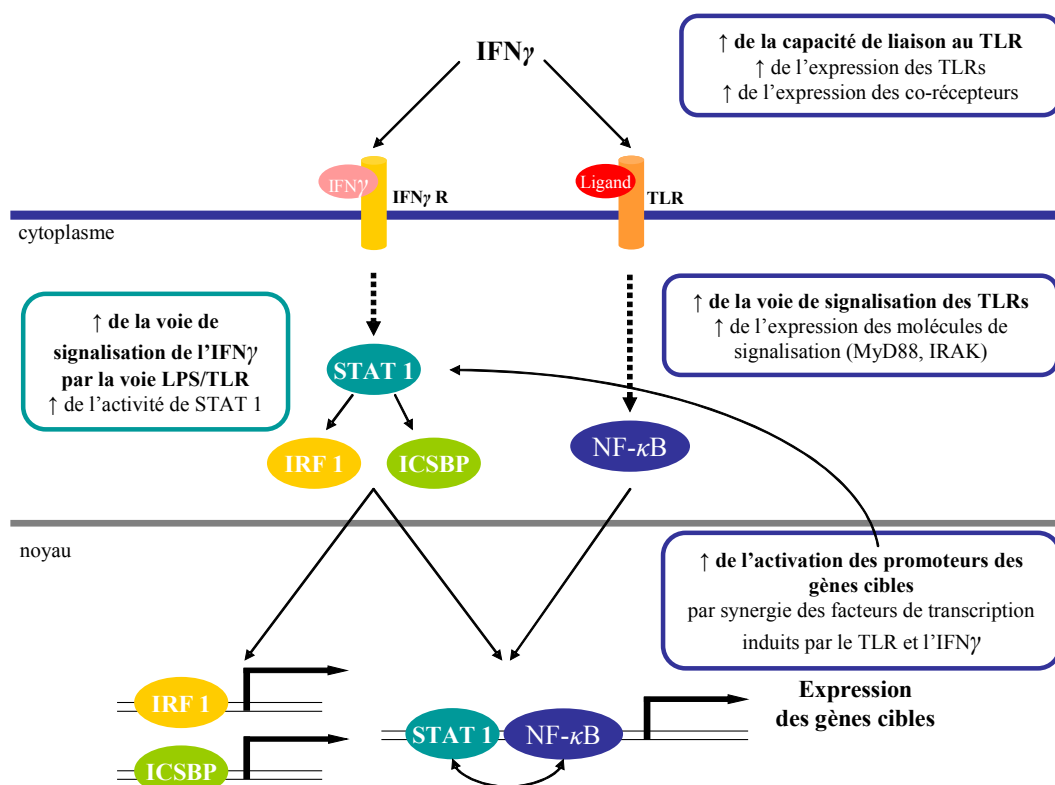


Figure 9 : Voies de signalisation de l'IFN γ (d'après Schroder *et al.*, 2006)

Le LPS est un important constituant de la membrane externe des bactéries Gram - et un des plus puissants initiateurs de la réponse inflammatoire. L'activation du TLR par le LPS est médiée par un ensemble de molécules co-activatrices. La *LPS binding protein* (LBP) va former un

complexe avec le LPS qui va être reconnu par une protéine de membrane, le CD14. C'est ensuite le TLR-4 qui va permettre la transduction du signal par la protéine adaptatrice MyD88 et la serine kinase IRAK et donc l'activation des facteurs de transcription tel que NF- κ B (Figure 10). D'autres protéines impliquées ou non dans ce complexe membranaire ont été identifiées comme ayant un rôle dans l'activation au LPS (MD-2, CD11 β , CD18, TREM-1 et DAP12). L'activation des macrophages par le LPS entraîne la production de différentes cytokines comme le TNF α , l'IL-1, -6, -8, -10, -12, -18, ainsi que de chimiokines (MIP-1, MCP-1), prostanoïdes, leucotriènes et molécules oxydantes issues entre autres de l'activation de la COX-2 et de l'iNOS également sous le contrôle de NF- κ B.

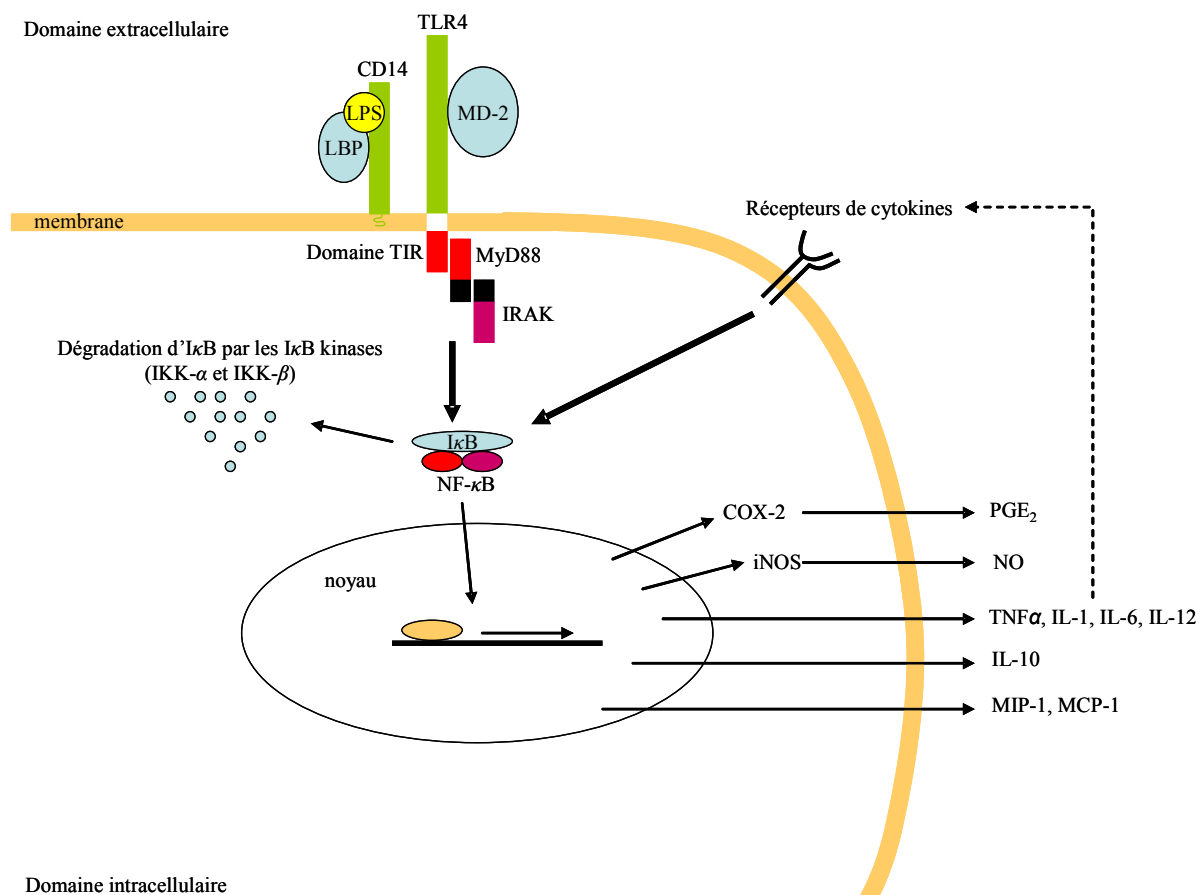


Figure 10 : Mécanisme de reconnaissance du LPS et de transduction du signal (d'après Aderem et Ulevitch, 2000)

NF- κ B joue un rôle central dans la régulation de la réponse immunitaire. Dans le choc septique, il intervient principalement dans deux phénomènes : l'activation des macrophages suivit d'une production accrue de médiateurs inflammatoires et l'activation massive des cellules endothéliales. En conditions normales, NF- κ B est présent sous forme inactive dans le cytoplasme lié à I κ B (*Inhibitor Kappa B*), protéine qui cache ses séquences de localisation nucléaire (Figure

10). Suite à un stimulus, c'est la phosphorylation d'I κ B qui va entraîner sa dégradation par le protéasome. Les séquences de localisation nucléaire de NF- κ B se retrouvent donc exposées permettant sa translocation dans le noyau. Une fois dans le noyau, NF- κ B se lie à des séquences spécifiques de l'ADN au niveau de régions promotrices, ce qui va entraîner l'activation de nombreux gènes. C'est la phosphorylation d'I κ B qui est l'étape clé de l'activation de NF- κ B, celui-ci étant considéré comme une cible thérapeutique importante dans le traitement de l'inflammation (Brasier, 2006). En effet, ce facteur de transcription régule, entre autres, l'expression de l'iNOS et la COX-2 ainsi que la production d'IL-6, IL-10 et de TNF α .

I.2 Le choc septique

I.2.1 Définition du choc septique

Une infection est l'invasion par un pathogène d'un tissu ou organe normalement stérile de l'organisme. La bactériémie est la présence de bactéries dans le sang. On parle de « *systemic inflammatory response syndrome* » ou SIRS lorsque au moins 2 des paramètres suivants sont détectés :

- température corporelle $> 38,3^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$;
- fréquence cardiaque $> 90/\text{min}$;
- fréquence respiratoire $> 20/\text{min}$ ou $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$;
- globules rouges $> 12\,000$ ou $< 4\,000/\text{mm}^3$ ou $> 10\%$ de cellules immatures.

La septicémie correspond à une infection identifiée associée à un SIRS. Une septicémie sévère est associée à une défaillance d'un ou plusieurs organes et d'une hypoperfusion ou hypotension. Le choc septique est caractérisé par une septicémie sévère associée à une hypotension artérielle persistante (Tsiotou *et al.*, 2005) (Figure 11).

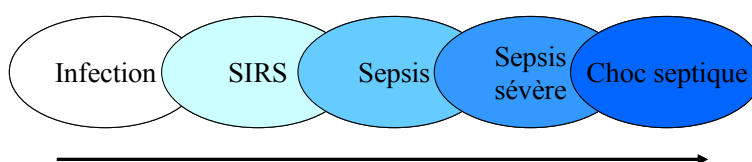


Figure 11 : Les différentes étapes de l'infection au choc septique (d'après Tsiotou *et al.*, 2005)

Le choc septique est une cause de morbidité et de mortalité très importante chez les patients hospitalisés qui ne cesse d'augmenter par le nombre important d'opérations chirurgicales

hautement invasives, d'accidents de la route et du nombre de patients d'âge avancé (Klosterhalfen et Bhardwaj, 1998).

Les principales causes de septicémie sont des infections au niveau des poumons (45 %), de l'abdomen (20 %) et des reins (10 %). Les principaux pathogènes impliqués dans cette pathologie sont les bactéries à Gram + (30-50 %) et les bactéries à gram - (25-30 %), interviennent aussi les champignons, parasites et virus.

Environ 150 000 personnes meurent chaque année en Europe et plus de 200 000 aux États-Unis d'une septicémie sévère. C'est l'une des premières causes de mortalité aux soins intensifs (60 %). La septicémie représente 10 % des décès dans le monde (López-Bojórquez *et al.*, 2004).

I.2.2 Physiopathologie du choc septique

Une infection est causée par l'invasion d'un pathogène ou d'un microorganisme potentiellement pathogène dans l'organisme qui va déclencher une série de processus immunologiques complexes. L'activation du système immunitaire suite à une infection est généralement bénéfique pour l'organisme. Cependant, une réponse immunitaire inadaptée, excessivement ou trop faiblement régulée, peut entraîner une libération inadéquate des composés endogènes de l'inflammation. L'augmentation des phénomènes inflammatoires et de coagulations, et la diminution de la fibrinolyse entraînent une perte de l'homéostasie aboutissant à une défaillance circulatoire. Ce sont la thrombose des petits et grands vaisseaux et les phénomènes hémorragiques qui vont entraîner la mort. Les mécanismes de défense incluent l'activation des neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales, la libération de cytokines, ainsi que l'activation du système du complément et du système coagulation/fibrinolyse.

I.2.2.a Les cellules impliquées dans le choc septique

La septicémie est caractérisée par la migration de leucocytes activés de la circulation sanguine vers le site inflammatoire et par une production accrue de leucocytes.

Les macrophages sont les premières cellules de l'organisme à se retrouver en contact avec l'agent pathogène, ils jouent donc un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire. Ils exercent divers effets cellulaires et intercellulaires et libèrent différentes

cytokines ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$). C'est la stimulation excessive et prolongée des macrophages par le pathogène qui aboutit à l'augmentation de la réponse inflammatoire (Figure 12).

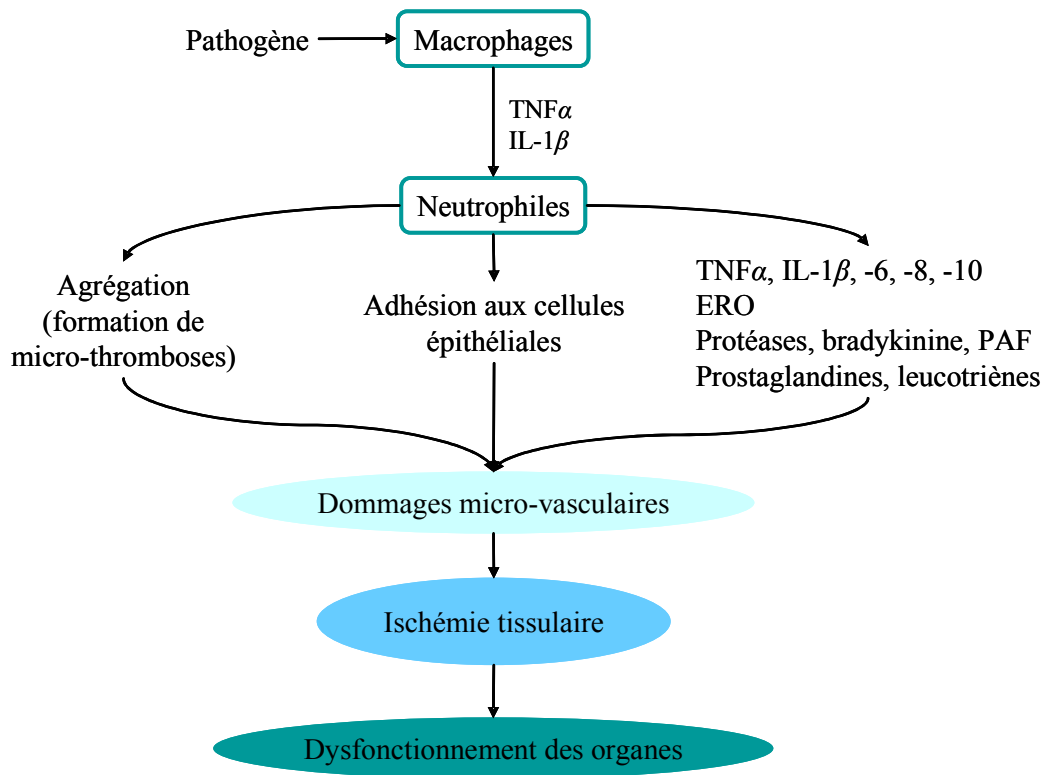


Figure 12 : Rôle des macrophages et neutrophiles dans le choc septique (d'après Tsiotou *et al.*, 2005)

Les neutrophiles produisent un grand nombre de molécules ayant pour but de détruire le pathogène, mais leur production excessive peut également engendrer des dommages cellulaires. L'activation des neutrophiles entraîne leur adhésion aux cellules endothéliales, la formation de micro-thromboses par agrégation ainsi que la production de médiateurs inflammatoires. L'ensemble de ces phénomènes aboutit à des dommages micro-vasculaires, une ischémie tissulaire et à un dysfonctionnement des organes (Tsiotou *et al.*, 2005).

Le dysfonctionnement de l'endothélium joue un rôle central dans la pathogénèse du choc septique. Le système endothélial est l'interface entre la circulation sanguine et les tissus, c'est donc la première cible des molécules produites par les cellules circulantes. L'activation des cellules endothéliales est caractérisée par une adhésion, une diapédèse et un infiltrât cellulaire accompagnés par des altérations biochimiques et structurelles. Les dommages micro-vasculaires des cellules endothéliales sont issus de la production de molécules telles que les ERO, les métabolites de l'acide arachidonique, du PAF, de l'activation des neutrophiles et de la production

de cytokines par les monocytes. Les cellules endothéliales produisent elles-même des médiateurs inflammatoires suite à leur activation. Ces dommages entraînent une perméabilité vasculaire qui aboutit à un œdème et une hypotension.

I.2.2.b Les médiateurs dans le choc septique

Les cytokines sont un élément clé de la réponse inflammatoire, on parle de cytokines pro-inflammatoires pour le $\text{TNF}\alpha$, l'IL- 1β ou l'IL-8 et de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10. L'IL-1 et le $\text{TNF}\alpha$, libérés par les macrophages activés, ont une action synergique et vont induire un grand nombre d'effets biologiques en passant principalement par l'activation des neutrophiles (Figure 12).

Le $\text{TNF}\alpha$, produit très tôt lors de l'infection, est une des cytokines les plus importantes dans la physiopathologie du choc septique. Le $\text{TNF}\alpha$ va induire des dommages tissulaires principalement par l'intermédiaire des neutrophiles qui vont produire élastase, ions superoxydes, peroxyde d'hydrogène, PLA_2 , PAF, LTB_4 et TxA_2 (Tsiotou *et al.*, 2005).

L'IL- 1β stimule la synthèse de prostaglandines, élastases et collagénases, active la migration trans-endothéliale des neutrophiles et active les cellules microvasculaires de l'endothélium qui vont elles-même libérer de l'IL-8 et du PAF. La libération d'IL- 1β nécessite la synthèse de son précurseur, la pro-IL- 1β qui est clivé en IL- 1β et libéré par la cellule suite à un deuxième stimulus.

L'IL-6 est considérée comme une cytokine pro-inflammatoire, elle augmenterait le potentiel cytotoxique des neutrophiles, mais semble également posséder des propriétés anti-inflammatoires. La production d'IL-6 est atténuée par le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL- 1β .

L'IL-8 entraîne l'activation et la migration des neutrophiles ainsi que l'expression des molécules d'adhésion de surface.

L'IL-12 a pour cible les NK et les cellules T qui vont libérer de l'IFN γ et donc activer en retour les macrophages et la libération de cytokines inflammatoires. L'IL-12 participe à l'amplification de la réponse inflammatoire.

L'IL-10 est la cytokine anti-inflammatoire et immuno-suppressive majeure qui module la réponse inflammatoire de nombreuses cellules immunitaires. Elle inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires comme le $\text{TNF}\alpha$, l'IL- 1β , l'IL-6 par inhibition de l'activation de NF- κ B (Mosser et Zhang, 2008; Saraiva et O'Garra, 2010).

La cinétique de production des cytokines durant les premières étapes du choc septique montrent deux pics majeurs pouvant être corrélé aux phases Th1 et Th2 (López-Bojórquez *et al.*, 2004) (Figure 13).

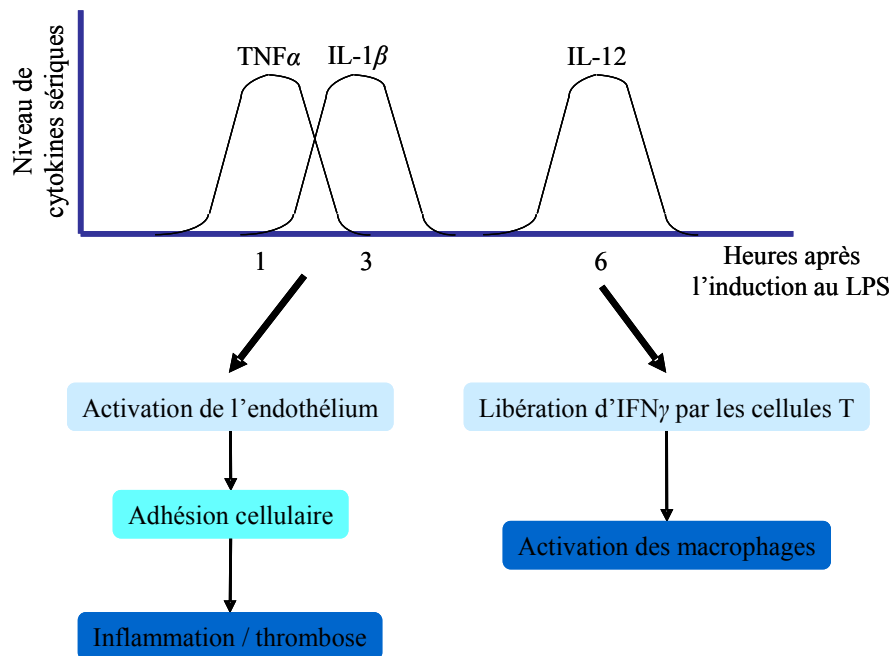


Figure 13 : Cinétique de production des cytokines durant les premières étapes du choc septique

(d'après López-Bojórquez *et al.*, 2004)

On retrouve également d'autres médiateurs de l'inflammation dans le choc septique. Les ERO ont un rôle de défense de l'organisme vis-à-vis des micro-organismes par désorganisation des membranes cellulaires entraînant la nécrose des cellules. Cependant la surproduction de ERO est un phénomène important dans le choc septique comme dans d'autres pathologies pouvant aboutir à un maintien de l'inflammation. Le monoxyde d'azote est également produit en excès dans le choc septique, entraînant vasodilatation et dépression myocardique. La voie de la PLA₂ est également impliquée dans le choc septique par production de PAF et d'écossanoïdes.

I.2.2.c Les désordres de coagulation dans le choc septique

La coagulation et l'inflammation sont intimement liées. Au cours du choc septique, c'est le profond dérèglement entre l'équilibre coagulation/fibrinolyse qui va entraîner des thromboses intra-vasculaires. L'activation de la coagulation va entraîner la formation de thromboses et de micro-agrégats et l'inhibition de la fibrinolyse entraîne une coagulation intra-vasculaire disséminée ou CIVD. Ces deux phénomènes associés à la diminution des systèmes

anti-coagulants de contrôle (protéine C) entraînent une augmentation de l'inflammation qui peut aboutir à une défaillance multi-viscérale.

II L'œdème : un modèle d'inflammation aiguë

Il existe un grand nombre de modèles *in vivo* d'inflammation aiguë par création d'un œdème. Les souris et les rats sont les espèces animales les plus utilisées, et la création de l'œdème se fait généralement à l'oreille ou à la patte. Différentes substances sont utilisées. Le tétradécanoylphorbol acétate (TPA), l'acide arachidonique (Young *et al.*, 1984) et l'huile de croton (Van Arman, 1974) sont classiquement utilisés pour l'œdème à l'oreille. La PLA₂ (Neves *et al.*, 1993), le dextran, l'histamine (Parratt et West, 1958), la sérotonine, la bradykinine, les PGE₂, le LTB₄, l'acide arachidonique, la hyaluronidase sont utilisés pour l'induction de l'œdème à la patte, mais c'est la carragénine (Winter *et al.*, 1962) qui est le plus largement utilisée.

La carragénine est un polysaccharide sulfaté présent dans certaines algues rouges. Elle existe sous trois formes (κ , ι , λ) et c'est la forme λ qui va induire une réponse pro-inflammatoire. Celle-ci peut se diviser en deux phases :

- une phase précoce (0 h à 1 h) suivant l'injection de carragénine caractérisée par la libération d'histamine, de sérotonine, de bradykinine et de 5-hydroxytryptamine contribuant à la perméabilité vasculaire et donc à la formation de l'œdème (Di Rosa *et al.*, 1971). Cette phase n'est pas inhibée par les AINS.
- une phase tardive (1 h à 6 h) caractérisée par la libération d'eicosanoïdes et d'un infiltrât de neutrophiles qui vont libérer des médiateurs inflammatoires et des radicaux libres. C'est la combinaison du NO[•] et de O₂^{•-} qui va engendrer la formation de peroxynitrites et donc de nitrotyrosines aux niveaux des protéines (Cuzzocrea *et al.*, 1998; Salvemini, Wang, Bourdon, *et al.*, 1996; Salvemini, Wang, Wyatt, *et al.*, 1996). Les AINS (indométacine, aspirine) agissent sur cette phase tardive par inhibition de l'activité de la COX-2 et donc de la production de prostaglandines.

III L'asthme : un modèle d'inflammation chronique

L'inflammation chronique est une inflammation de durée prolongée due à la persistance des facteurs d'agression. Elle peut suivre un épisode d'inflammation aiguë ou débiter de façon insidieuse sous forme d'une réponse de faible intensité. Les facteurs prédisposants sont une agression persistante, une réponse inadéquate de l'hôte ou encore une maladie auto-immune chronique. L'inflammation chronique est caractérisée par un infiltrât de cellules mononucléées (macrophages, lymphocytes, plasmocytes), une destruction tissulaire et une tentative de cicatrisation par prolifération des fibroblastes, d'une angiogénèse et d'un dépôt de collagène.

On distingue deux types d'inflammation chronique :

- Inflammation chronique granulomateuse où les cellules du système des phagocytes mononucléés s'organisent en amas ou en nodules appelés granulomes.
- Inflammation chronique non-granulomateuse caractérisée par une infiltration de lymphocytes, éosinophiles, plasmocytes et associée à une nécrose et une fibrose : c'est le cas de l'asthme.

III.1 Généralités sur l'asthme

L'asthme est une pathologie invalidante qui représente dans les pays industrialisés, un problème de santé publique croissant. L'asthme touche tous les groupes d'âges mais se déclare souvent pendant l'enfance. En France, la prévalence est actuellement de 5 à 7 %, et cette maladie engendre près de 2 000 morts par an. Dans le monde, autour de 300 millions de personnes seraient touchées par cette pathologie (Masoli *et al.*, 2004).

Définition actuelle de l'asthme par l'OMS :

« L'asthme est un désordre inflammatoire chronique des voies respiratoires dans lequel différentes cellules et éléments cellulaires jouent un rôle. L'inflammation chronique, associée à une hyperréactivité des voies respiratoires, aboutit à des épisodes répétés de sifflements, d'essoufflements, de sensations de blocage de poitrine et de toux, particulièrement la nuit ou tôt le matin. Ces épisodes sont habituellement liés à une obstruction du flux aérien dans les bronches, obstruction souvent réversible spontanément ou sous l'effet d'un traitement. »

L'asthme est une maladie chronique qui se traduit le plus souvent par des épisodes aigus de gêne respiratoire. Cette gêne est provoquée par une diminution du calibre des bronches

(broncho-spasmes) et un état inflammatoire chronique. La bronchoconstriction se traduit par un sifflement à la respiration et s'accompagne d'une surproduction de mucus dans les voies respiratoires. On observe parfois une toux et un sentiment d'anxiété en relation avec la sensation d'oppression thoracique. L'asthme se traduit par des symptômes de courte durée survenant par accès qui sont en partie réversibles spontanément ou à l'aide d'un traitement.

L'asthme est une maladie respiratoire plurifactorielle dont l'expression est fonction de facteurs souvent liés à l'environnement. Les facteurs environnementaux les plus importants sont les facteurs allergiques (pollens, acariens, animaux domestiques), viennent ensuite les infections (virus), l'alimentation, la pollution, le tabagisme, les médicaments, des facteurs physiques (effort, froid), endocriniens, psychologiques (stress), ou encore professionnels. L'hérédité joue également un rôle prédisposant dans l'asthme (Ober, 2005 ; Wiesch *et al.*, 1999), ainsi que l'obésité (Beuther, 2009) et le sexe. L'atopie est le facteur principal prédisposant à l'asthme. Elle est reflétée par la capacité de produire une quantité anormalement élevée d'IgE en réponse à l'exposition à des substances de l'environnement. Ce facteur prédisposant permet de distinguer deux types d'asthme :

- l'asthme extrinsèque ou atopique provenant d'une hyperréactivité aux allergènes et se caractérisant par une infiltration d'éosinophiles et de lymphocytes, accompagnée d'une production d'IgE ;
- l'asthme intrinsèque ou non-atopique ne provenant pas d'une hyperréactivité aux allergènes, mais plutôt d'une agression par des produits irritants (fumée) ou certaines infections virales.

L'apparition de l'asthme résulte donc de la conjonction de facteurs génétiques (susceptibilité individuelle) et de facteurs environnementaux.

III.2 Physiopathologie de l'asthme

Sur le plan physiopathologique, les principales anomalies retrouvées sont les modifications morphologiques, l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation bronchique. Sur le plan thérapeutique, c'est l'inflammation bronchique qui constitue la principale cible des traitements anti-asthmatiques actuels.

III.2.1 L'inflammation bronchique

L'inflammation bronchique est un mécanisme complexe qui par rétro-contrôle positif conduit à une auto-propagation de la maladie.

On retrouve au niveau bronchique d'un patient asthmatique un nombre important de cellules inflammatoires et de médiateurs tels que l'histamine, les prostaglandines et thromboxanes, les leucotriènes, le PAF, la bradykinine, les endothélines, certaines cytokines ainsi que le NO[•] (Corrigan, 2008).

L'inflammation bronchique peut se décomposer en deux phases (Figure 14) :

- une phase précoce ou immédiate correspondant à l'activation par l'allergène des mastocytes, macrophages et éventuellement des basophiles ce qui entraîne la sécrétion d'IgE. L'activation de ces cellules entraîne la libération de médiateurs inflammatoires ce qui conduit à une bronchoconstriction, un œdème et une hyperproduction de mucus ;
- une phase tardive qui correspond à l'auto-entretien du processus inflammatoire initié lors de la phase précoce. Elle est caractérisée par un recrutement via l'expression de molécules d'adhésion et une persistance des cellules inflammatoires par libération de cytokines et chimiokines et par diminution de l'apoptose. Interviennent également les phénomènes de réparation tissulaire et de remodelage par activation des cellules résidentes.

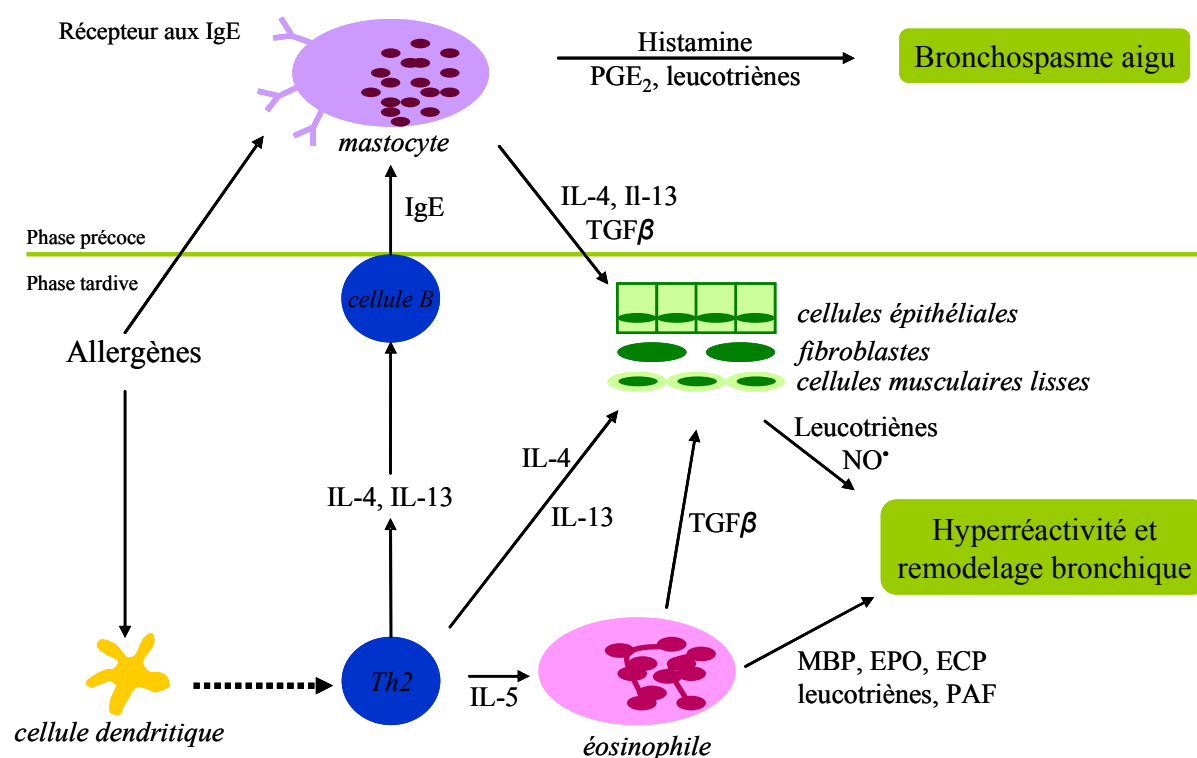


Figure 14 : Implications des différents types cellulaires dans les phases précoce et tardive des mécanismes physiopathologiques de l'asthme (d'après Corrigan, 2008)

Différents types de cellules sont impliqués dans le maintien de l'inflammation (Bousquet *et al.*, 2000 ; Corrigan, 2008).

Les cellules dendritiques présentes dans les voies aériennes interagissent avec l'allergène dès les premiers mois de la vie, ce processus de sensibilisation conduira ou non au développement de l'asthme. L'interaction avec l'allergène induit la maturation des cellules dendritiques qui migrent vers les organes lymphoïdes secondaires afin de présenter les structures peptidiques de l'antigène aux lymphocytes T dits naïfs.

Les lymphocytes impliqués dans l'asthme sont principalement les lymphocytes T. La présentation de l'allergène par les cellules dendritiques aux lymphocytes T entraîne une réponse préférentiellement de type Th2, et altère donc la balance Th1/Th2. Cette altération de la balance pourrait provenir d'une faible exposition aux endotoxines pendant l'enfance, ce qui diminuerait la stimulation de la réponse Th1 au profit de la réponse Th2. Les lymphocytes Th1 participent au développement des réactions d'hypersensibilité retardée et se caractérisent par une production prédominante d'IFN γ , mais aussi d'IL-2, -3 et de TNF β . Ces cytokines entraînent l'activation des cellules B, T et NK. Les lymphocytes Th2, par l'intermédiaire de l'IL-4 et -13, renforcent la production d'IgE des plasmocytes et par l'intermédiaire de l'IL-3, -4, -5 et le GM-CSF

(*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), entraînent la différenciation et l'activation des éosinophiles, des basophiles et des mastocytes. Certaines cytokines interviennent aussi au niveau de l'épithélium bronchique et de l'endothélium vasculaire, d'autres régulent négativement l'inflammation (IL-10, -12, -13, -9) (Bachoual et Boczkowski, 2005).

Les mastocytes sont les cellules « *starter* » de la réaction allergique IgE dépendante, ils sont présents tout au long de l'arbre respiratoire en infiltrant la muqueuse bronchique et sont donc présents en plus grande quantité chez le patient asthmatique. Ils possèdent à leur surface des récepteurs aux IgE. Après activation, les mastocytes libèrent des médiateurs préformés (histamine, tryptase, $\text{TNF}\alpha$...) et néoformés (éicosanoïdes et cytokines) qui entraînent une bronchoconstriction, un œdème des voies aériennes et une hypersécrétion de mucus lors de la première phase de la réaction allergique.

Les macrophages peuvent infiltrer la muqueuse bronchique et libérer un certain nombre de médiateurs. Ils participent ainsi aux phénomènes inflammatoires bronchiques dans la phase précoce et dans la réponse tardive IgE dépendante. Ils produisent également des radicaux libres issus de leur activité phagocytaire.

Les polynucléaires éosinophiles sont les cellules clés de l'inflammation chez l'asthmatique. Ils sont retrouvés dans la muqueuse bronchique de façon quasi-constante et l'augmentation de leur nombre peut s'expliquer soit par un afflux de cellules sanguines, soit par une augmentation de leur survie. Les éosinophiles activés libèrent un grand nombre de médiateurs liés au granule ou résultant d'une activation membranaire. On retrouve des médiateurs lipidiques (LTC_4 , PAF) intervenant dans la bronchoconstriction et la perméabilité vasculaire, et des protéines cytotoxiques (ECP pour *Eosinophil Cationic Protein*, MBP pour *Major Basic Protein*, EPO pour *Eosinophil Peroxydase Protein*) agissant directement sur les cellules de l'épithélium bronchique. Ils sécrètent également un grand nombre de cytokines qui contribuent aux phénomènes inflammatoires. L'ensemble de ces médiateurs contribue aux phénomènes d'obstruction et d'hyperréactivité bronchiques (Tillie-Leblond *et al.*, 2004).

Les polynucléaires neutrophiles sont retrouvés dans certaines formes d'asthme et font immédiatement suite à un état inflammatoire exacerbé.

Les cellules structurelles des voies respiratoires impliquées sont les cellules épithéliales bronchiques et les cellules endothéliales. Les cellules épithéliales sont rapidement lésées ce qui entraîne une desquamation corrélée à l'hyperréactivité bronchique. Ces cellules sont également

capables de libérer certains médiateurs (15-HETE, PGE₂, GM-CSF), et présentent une expression accrue de l'iNOS conduisant à la production de NO^{*}. Le NO^{*} est un bronchodilatateur mais peut aussi avoir des effets néfastes dans l'asthme par augmentation du flux sanguin et de l'exsudation plasmatique dans les voies aériennes. Les cellules endothéliales sont, quant à elles, impliquées dans des phénomènes de vasomotricité et de vasoperméabilité, ce qui participe à l'œdème bronchique et à l'augmentation de la viscosité du mucus et donc à l'aggravation de l'obstruction bronchique.

III.2.2 Les conséquences fonctionnelles et cliniques

III.2.2.a L'hyperréactivité bronchique

L'hyperréactivité bronchique est une réaction bronchique exagérée, de type bronchoconstriction, lors de l'exposition à des stimuli physiques, chimiques ou pharmacologiques dont l'inflammation bronchique semble être la cause majeure. Plusieurs mécanismes sont susceptibles d'expliquer l'hyperréactivité bronchique :

- Anomalies du muscle lisse bronchique : hypertrophie bronchique, contractilité anormale, altérations des récepteurs membranaires des cellules musculaires lisses d'origine constitutionnelle ou induits par les médiateurs de l'inflammation.
- Anomalies du système nerveux autonome : 3 voies nerveuses sont impliquées : le système cholinergique, le système adrénergique et le système NANC.
- Réactions inflammatoires locales chronique et aiguë des voies respiratoires.

La mise en évidence clinique de l'hyperréactivité bronchique est réalisée selon deux tests : un test direct par administration de bronchoconstricteurs pharmacologiques (métacholine, histamine) qui vont agir directement sur leurs récepteurs au niveau du muscle lisse bronchique et un test indirect par stimulation des cellules inflammatoires au niveau bronchique conduisant indirectement à la bronchoconstriction par sécrétion de médiateurs inflammatoires. Ce test utilise des stimuli physiques (exercice, air froid) ou des bronchoconstricteurs indirects (mannitol, adénosine, bradykinine).

III.2.2.b L'obstruction et le remodelage bronchique

L'obstruction bronchique entraîne la diminution du flux respiratoire et provoque l'apparition des différents symptômes caractéristiques de l'asthme : toux, oppression, sibilances. L'obstruction bronchique est principalement due à l'inflammation et le syndrome aigu repose sur plusieurs facteurs :

- le broncho-spasme des muscles lisses entourant l'ensemble des voies aériennes (traitement par les β_2 -mimétiques) ;
- l'œdème de la muqueuse du à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et à l'infiltration cellulaire (traitement par les glucocorticoïdes) ;
- les sécrétions endo-bronchiques provenant de l'extravasation vasculaire et de l'hypersécrétion des glandes à mucus pouvant aller jusqu'à l'obstruction des bronchioles.

Au cours de la pathologie asthmatique, les phénomènes de réparation et de réaction inflammatoire se succèdent. Malgré ces phénomènes de réparation, un déclin progressif et irréversible des fonctions respiratoires peut survenir entraînant un remodelage des voies respiratoires (Benayoun *et al.*, 2003 ; Bousquet *et al.*, 2000). Les modifications morphologiques et anatomo-pathologiques qui ont lieu sont variables selon la sévérité de l'asthme. On observe :

- une perte de la ciliature bronchique ;
- une destruction irrégulière (desquamation) de la couche épithéliale ;
- un pseudo épaissement de la membrane basale avec dépôt de fibres de collagènes et multiplication du nombre de myofibroblastes, accompagné d'une fibrose sous-épithéliale ;
- une infiltration cellulaire du chorion (éosinophiles, lymphocytes) ;
- une hypertrophie du muscle lisse ;
- une hyperplasie des glandes muqueuses ;
- un bouchon muqueux intra-bronchique constitué de mucus et de débris intra-luminaux d'éosinophiles.

III.2.3 Le stress oxydant dans l'asthme

Les poumons sont les organes les plus exposés à un stress oxydant continu du fait des échanges gazeux qui s'y produisent. C'est le contact direct avec l'oxygène et l'environnement extérieur qui est source de stress oxydant.

L'asthme est caractérisé par des biomarqueurs spécifiques dans l'air expiré des patients. Ces biomarqueurs reflètent l'altération de l'équilibre rédox dans les voies aériennes par une augmentation de la production d'ERO et d'ERN lors des exacerbations asthmatiques entraînant inflammation et hyperréactivité bronchique, hyperperméabilité vasculaire et remodelage tissulaire autant dans les modèles animaux que chez l'homme (Andreadis *et al.*, 2003 ; Sugiura et Ichinose, 2008).

Les oxydants au niveau pulmonaire sont, soit d'origine endogène, soit d'origine exogène. Les oxydants exogènes provenant de l'environnement, comme l'ozone, la fumée de cigarette, les particules ainsi que les nitrites atmosphériques, accentuent l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation dans l'asthme.

Les oxydants retrouvés au niveau pulmonaire sont l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, le monoxyde d'azote et les peroxydinitrites. D'autres molécules résultant de l'oxydation de protéines et lipides participent également au stress oxydatif.

III.2.3.a Les ERO

Les ERO endogènes regroupent l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle. Au niveau bronchique, ils peuvent être générés par un grand nombre de voies métaboliques. La production de ERO par les neutrophiles, éosinophiles et macrophages est augmentée chez les patients asthmatiques et a été corrélée avec la sévérité de la maladie, entraînant un auto-entretien de l'inflammation et de l'hyperréactivité bronchique (Rahman *et al.*, 2006).

L'anion superoxyde est produit durant la respiration mitochondriale et par la NADPH oxydase que l'on retrouve dans les neutrophiles, éosinophiles, monocytes et macrophages. La plupart du $O_2^{\cdot -}$ produit *in vivo* est transformé par dismutation en H_2O_2 par voie enzymatique (SOD) ou non. Le peroxyde d'hydrogène est également produit par des enzymes oxydases comme la xanthine oxydase, la monoamine oxydase ou l'acide aminé oxydase. Le radical hydroxyle,

radical le plus réactif, est issu soit des réactions catalytiques impliquant l'anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène, soit par les voies impliquant l'EPO ou la MPO.

III.2.3.b Les ERN

Le NO[•] joue un rôle important dans l'asthme, il interviendrait dans les phénomènes d'inflammation et dans l'hyperréactivité bronchique. Il aurait également une influence sur l'infiltrat d'éosinophiles (Eynott *et al.*, 2002 ; Ferreira *et al.*, 1998). Le taux de NO[•] dans l'air exhalé de patients asthmatiques est trois fois supérieur à la normale, la synthèse excessive de NO[•] est impliquée dans la pathogénèse de l'inflammation dans l'asthme (Dweik *et al.*, 2001 ; Guo *et al.*, 2000).

C'est l'augmentation de l'expression de l'iNOS et de son activité au niveau de l'épithélium bronchique qui est responsable de la surproduction de NO[•] dans les bronches. La sur-expression de l'iNOS dans les bronches est régulée par l'IFN, l'IL-1 β , le TNF α et les facteurs de transcription JAK, STAT-1 et NF- κ B (Andreadis *et al.*, 2003).

Le NO[•] produit dans les poumons joue différents rôles de régulation. Il intervient dans la relaxation du muscle lisse bronchique et contribue à la formation de radicaux libres. Les peroxy-nitrites, par combinaison avec l'anion superoxyde, sont responsables de la plupart des détériorations. La nitrosation des protéines peut entraîner une altération de leurs fonctions ou de leurs structures et participer ainsi au stress oxydant. Le NO[•] produit au niveau bronchique augmente également la perméabilité vasculaire, stimule la sécrétion de mucus et l'infiltration des cellules pro-inflammatoires ainsi que la réaction de type Th2 (Meurs *et al.*, 2003).

III.2.3.c Les granulocytes et les monocytes

Les leucocytes contiennent des enzymes qui jouent un rôle important dans la défense de l'organisme vis-à-vis des agents pathogènes. Ces enzymes, stockées dans les granules des leucocytes, vont être libérées lors de l'activation des leucocytes. On retrouve l'EPO dans les éosinophiles et la MPO dans les neutrophiles et monocytes, ces enzymes font partie de la super-famille des peroxydases. Ces enzymes potentialisent l'effet du H₂O₂ et peuvent engendrer des lésions tissulaires (Andreadis *et al.*, 2003 ; Bousquet *et al.*, 2000).

La MPO permet la formation d'acide hypochloreux, agent anti-bactérien très puissant, à partir de peroxyde d'hydrogène et d'ions chlorure. L'augmentation du nombre de neutrophiles et donc de la production des ERO a été corrélée avec l'augmentation de la réactivité bronchique.

Le recrutement des éosinophiles est un des marqueurs cellulaires précoce de l'asthme, les éosinophiles jouant un rôle dans la pathogénèse de la maladie. Lors de leur activation, les éosinophiles libèrent des protéines cytotoxiques présentes dans les granules (EPO, MBP, ECP) ainsi que des neurotoxines. Les éosinophiles et leurs produits sont des marqueurs de la sévérité de l'inflammation. Les produits dérivés des éosinophiles entraînent la dénudation de l'épithélium bronchique, une déstructuration de l'épithélium, une augmentation de la perméabilité vasculaire, de l'œdème et de l'hyperréactivité bronchique.

III.2.3.d Les défenses antioxydantes des bronches

Pour lutter contre le stress oxydant, l'organisme possède un système antioxydant très développé présent au niveau de l'épithélium bronchique et qui est constitué à la fois de systèmes enzymatiques (SOD, catalase, peroxydases, hème oxydase, glutarédoxine, thiorédoxine, peroxyrédoxine) et non-enzymatiques (vitamine C, urate, glutathion réduit, vitamine E, β -carotène). C'est le déséquilibre oxydants-antioxydants qui est à l'origine du stress oxydant associé aux pathologies pulmonaires (Comhair et Erzurum, 2010).

Il a été montré une diminution de l'activité des SOD intra et extra-cellulaire dans les bronches de patients asthmatiques, cette diminution pourrait être liée à l'inactivation par nitration ou oxydation de la protéine (Comhair *et al.*, 2000 ; De Raeve *et al.*, 1997). Cette réduction de l'activité des SOD contribue à l'augmentation du stress oxydant. Cependant, une autre étude a montré une augmentation significative de l'activité des SOD dans un modèle expérimental d'asthme (Nishida *et al.*, 2002). Une inhibition de l'activité de la catalase et de la glutathion peroxydase a également été mise en évidence chez des patients asthmatiques (Varshavskii *et al.*, 2003). Une augmentation de la glutathion peroxydase extra-cellulaire chez des patients asthmatiques en réponse à l'augmentation des radicaux libres a également été observée (Comhair *et al.*, 2001). Les taux de glutathion de l'épithélium bronchique sont augmentés chez les patients asthmatiques (Smith *et al.*, 1993), ainsi que la γ -glutamylcystéine synthétase (Rahman *et al.*, 1996) qui est une enzyme impliquée dans la synthèse de GSH. Les taux de thiorédoxines et glutarédoxines, enzymes antioxydantes, sont également augmentés dans l'asthme (Reynaert *et al.*, 2007 ; Yamada *et al.*, 2003).

Une étude a également montré une augmentation du statut oxydant total, de la peroxydation lipidique et de la capacité antioxydante totale chez des enfants asthmatiques, l'exposition à un stress oxydant entraînant une augmentation de la réponse antioxydante (Cakmak *et al.*, 2009).

L'expression de certains gènes impliqués dans la protection contre le stress oxydant est induite par le stress oxydant lui-même. Le facteur de transcription Nrf2, sensible au statut rédox de la cellule, va réguler un grand nombre de gènes antioxydants (Cho et Moon, 2010), la perturbation de Nrf2 ayant montré une augmentation de la sensibilité à l'asthme allergique chez la souris (Rangasamy *et al.*, 2005). Il semble exister différents profils antioxydants en fonction du type d'antioxydant observé, du site d'action et de l'origine du processus oxydatif (Rahman *et al.*, 2006).

III.3 Les traitements de l'asthme

Le traitement de l'asthme vise à corriger à la fois le broncho-spasme causé par l'hyperréactivité bronchique des voies respiratoires et à traiter l'inflammation bronchique. Il existe des médicaments pour le traitement de la crise ainsi que pour un traitement de fond.

Le traitement des broncho-spasmes repose sur l'utilisation des bronchodilatateurs β -2 stimulants à action courte ou prolongée, de la théophylline et ses dérivés ainsi que des bronchodilatateurs anticholinergiques. Les β -2 mimétiques ont une action spasmolytique qui contribue à réduire le spasme, ceux à action courte sont utilisés lors des crises, et ceux à action prolongée sont utilisés comme traitement de fond de la maladie pour prévenir les crises. Le traitement de l'inflammation repose sur la corticothérapie. Il existe certains médicaments adjuvants ou alternatifs : cromones, antileucotriènes, zaditen (seul Anti-H₁ utilisé dans l'asthme). La voie principale d'administration est la voie inhalée qui permet la délivrance du principe actif directement sur le lieu de l'inflammation et donc de limiter les effets secondaires généraux. L'association des β -2 mimétiques de longue durée d'action et des corticoïdes permet la prise en charge de l'asthme chronique.

Chapitre 5. Phytochimie d'*Astrocaryum vulgare* M.

Ce dernier chapitre présente les caractéristiques physico-chimiques de la pulpe d'awara ainsi que la composition chimique de son huile. Des considérations générales sur les huiles végétales, leurs fractions insaponifiables et plus spécifiquement sur les propriétés biologiques des différents microconstituants des huiles sont également présentées.

I La pulpe d'awara

Les caractéristiques du fruit sont variables selon les études, du fait de la provenance et du degré de maturité des fruits. Le poids moyen du fruit varie de 15 à 38 g. La pulpe représente 33 à 55 % du fruit frais, l'amande 13 à 20 % et le noyau 36 à 60 %. La variation importante de poids entre chaque partie du fruit pourrait être expliquée par la différence de teneur en eau des fruits (Tableau 1) (Bora et al., 2001; Ferreira et al., 2008; Lubrano et al., 1994; Oboh et Oderinde, 1988).

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques de la pulpe d'awara

(Bora et al., 2001 ; Ferreira et al., 2008 ; Lubrano et al., 1994 ; Oboh et Oderinde, 1988)

	Pulpe (%)
Humidité	10 à 45
Lipides	40 à 59
Protéines	4 à 8
Glucides	7 à 19
Cendres	2 à 3
Fibres	2 à 12

II L'huile de pulpe d'awara

II.1 Généralités sur les huiles végétales

Les corps gras d'origine végétale peuvent provenir de graines, de fruits oléagineux ainsi que de germes de céréales. On distingue parmi les huiles végétales, les huiles fluides comme l'huile

d'olive, de noix, de tournesol, composées essentiellement d'acides gras poly-insaturés, et des huiles dites concrètes (graisse) comme l'huile de coprah, l'huile de palme essentiellement composées d'acides gras saturés. Les corps gras ou lipides constituent la source la plus importante de calories et les acides gras sont des constituants importants des membranes.

Les lipides sont des composés aux structures diverses, généralement insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques apolaires. Les corps gras sont des mélanges complexes constitués de :

- 97 à 99 % de triglycérides ;
- 1 à 2 % d'acides gras libres, de phospholipides, mono et diglycérides ;
- 0,5 à 1 % de composés mineurs : colorants, hydrocarbures, stérols, vitamines, alcools constituant la fraction insaponifiable.

Les propriétés pharmacologiques des corps gras forment un ensemble disparate qui comprend à la fois les activités antibiotiques et antifongiques des acides gras, les activités pharmacologiques plus spécifiques aux acides gras poly-insaturés (agrégation plaquettaire, effet anti-hypertenseur, etc.) et l'activité de leurs constituants mineurs, en particulier des composés de l'insaponifiable. En effet, la fraction insaponifiable de plusieurs espèces végétales a montré un grand intérêt dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques ou encore alimentaires.

Les triglycérides sont formés de trois molécules d'acides gras identiques ou non, estérifiant un alcool qui est le glycérol. Le triglycéride sera en fonction de sa structure, monoacide, diacide ou triacide, la position en C2 sur le glycérol ayant une importance au niveau nutritionnel. Il existe donc une multitude de combinaisons. Les acides gras libres sont obtenus lors de la digestion sous l'action de lipases et sont ensuite utilisés par l'organisme pour synthétiser des phospholipides.

Les acides gras sont constitués d'une longue chaîne de carbone terminée par un groupement carboxyle (COOH). C'est le nombre d'atomes de carbone et de doubles liaisons éthyléniques (C=C) qui varie. La chaîne carbonée peut aller de 4 à 24 atomes de carbone, ce nombre est le plus souvent pair dans le règne végétal. On retrouve de 0 à 6 doubles liaisons dans un acide gras, on parle alors d'acide gras saturé, mono-insaturé, et poly-insaturé. Le nombre d'insaturations conditionne la réactivité chimique de la molécule, sa stabilité, ainsi que ses propriétés physiques et physiologiques. La position et la conformation *cis* (Z) ou *trans* (E) des doubles liaisons sont également des caractéristiques importantes pour identifier les acides gras. Généralement, les

doubles liaisons ne sont pas adjacentes, et l'on retrouve seulement des doubles liaisons *cis* dans le règne végétal. Les acides gras poly-insaturés sont indispensables à la cohésion cellulaire, ils interviennent dans la constitution des tissus et des membranes et assurent une certaine fluidité de part leur configuration *cis*. Les acides gras sont également une source importante d'énergie.

Les acides gras essentiels sont les acides gras que l'organisme est incapable de synthétiser lui-même, ils sont donc apportés par l'alimentation. Il existe deux types d'acides gras essentiels :

- les acides oméga-6 qui dérivent de l'acide linoléique (C18:2) ;
- les acides oméga-3 qui dérivent de l'acide α -linoléique (C18:3).

Les acides gras poly-insaturés jouent un rôle dans la fluidité membranaire et dans le développement du système nerveux. Avec leurs métabolites, ils jouent également un rôle de second messager et ont une activité de défense vis-à-vis des infections. Ils ont un effet protecteur vis-à-vis des maladies cardiovasculaires, inflammatoires et métaboliques ainsi que dans les maladies neurologiques (Das, 2006). Ces acides gras peuvent agir directement ou après conversion en éicosanoïdes ou autres produits par les mêmes voies métaboliques. Ils sont les précurseurs des différentes prostaglandines, leucotriènes, et autres molécules issues du métabolisme de l'acide arachidonique. Les lipoxines et résolvines sont également issues de ce métabolisme et possèdent des propriétés anti-inflammatoires. Les acides gras poly-insaturés sont donc des précurseurs de molécules pro- et anti-inflammatoires impliquées dans un grand nombre de pathologies.

Les autres constituants présents dans les huiles sont les phospholipides, les mono et diglycérides et les cires. Les phospholipides sont des esters de glycérol dont une fonction alcool est naturellement estérifiée par une molécule d'acide phosphorique, elle-même associée à une amine ou un sucre (inositol). On parle alors de phosphatidylsérine, phosphatidylcholine (lécithine), phosphatidyléthanolamine et phosphatidylinositol. Ces molécules sont amphiphiles ce qui leur confère des propriétés émulsifiantes, elles jouent un rôle physiologique au niveau des membranes cellulaires et sont également des transporteurs d'acides gras. Les monoglycérides et diglycérides proviennent de l'hydrolyse partielle des triglycérides, leurs fonctions alcools libres les rendent hydrophiles et leur confèrent des propriétés émulsifiantes. Les cires sont des esters d'acides gras et de mono-alcools aliphatiques. Chez les végétaux, elles contribuent à la formation de pellicules protectrices des graines et des fruits. Dans les huiles, leur présence est responsable de l'apparition d'un trouble par début de cristallisation à basse température.

II.2 Caractéristiques de l'huile de pulpe d'awara

Les rendements en huile de pulpe varient selon les études, de par la technique d'extraction et la préparation de la matière végétale à extraire. Le rendement en huile de pulpe varie de 9,5 à 22 % (Lubrano et al., 1994; Oboh et Oderinde, 1988). Les caractéristiques de l'huile sont présentées dans le Tableau 2 (Bora et al., 2001; Ferreira et al., 2008; Oboh et Oderinde, 1988).

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile de pulpe d'awara

(Bora et al., 2001 ; Ferreira et al., 2008 ; Oboh et Oderinde, 1988)

	Huile de pulpe
Indice de réfraction	1,45
Indice d'acide (mg KOH/g)	1,1 à 5,5
Indice de peroxyde (mEqO ₂ /Kg)	1,7 à 4,4
Indice d'iode (g I ₂ /100g)	63 à 82
Indice de saponification	110 à 189
Point de fusion (°C)	28-33
Teneur en insaponifiable (%)	0,5 à 1,5
Masse volumique (g/ml)	0,9

L'huile est composée principalement de triglycérides (87 à 94 % des lipides), mais on retrouve également des di et monoglycérides ainsi que des acides gras libres. La composition en acides gras est présentée dans le Tableau 3, les triglycérides majoritairement retrouvés sont composés d'acide palmitique, oléique et linoléique (Bora et al., 2001; Ferreira et al., 2008; Lubrano et al., 1994; Oboh et Oderinde, 1988).

Tableau 3 : Composition en acides gras principaux de l'huile de pulpe d'awara
(Bora et al., 2001 ; Ferreira et al., 2008 ; Lubrano et al., 1994 ; Oboh et Oderinde, 1988)

Acides gras	Huile de pulpe (%)
16 :0	13,9 à 30,4
17 :0	0,3
18 :0	0,9 à 9,8
19 :0	0,1
20 :0	0,8 à 4,6
22 :0	0,2
24 :0	0,2
16 :1	0,2 à 0,4
17 :1	0,1
18 :1	46,8 à 70,2
18 :2	2,1 à 26,1
18 :3	0,9 à 2,5

III La fraction insaponifiable de l'huile de pulpe d'awara

III.1 Généralités sur la fraction insaponifiable des huiles végétales

L'insaponifiable est constitué de composés qui, après hydrolyse basique de l'huile (saponification), ne sont pas solubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques classiques. La fraction insaponifiable représente seulement 0,5 à 2 % d'un corps gras. Cette teneur varie en fonction de la provenance du corps gras, de la technique d'extraction et des traitements que le corps gras a subit, elle peut aller exceptionnellement jusqu'à 10 % pour le beurre de karité. La teneur en insaponifiable de l'huile de pulpe d'awara est de l'ordre de 1 à 1,5 % (Bereau, 2001; Chaik, 2003; Lubrano et al., 1994).

Les constituants de l'insaponifiable sont caractéristiques du lipide étudié, ils constituent une empreinte pour l'identification de la source lipidique. On retrouve différentes classes de molécules parmi les phytostérols, les caroténoïdes, les tocophérols et tocotriénols ainsi que des hydrocarbures et des alcools gras.

Les hydrocarbures sont généralement retrouvés en faible quantité dans les lipides d'origine naturelle, ils sont aliphatiques saturés ou insaturés de 15 à 33 atomes de carbone. Le principal hydrocarbure d'origine terpénique est le squalène qui est le précurseur des triterpènes, on le retrouve dans l'huile d'olive et les huiles de poisson. Le karitène est un hydrocarbure que l'on retrouve dans le karité. Les alcools gras proviennent de l'hydrolyse d'esters divers, on les retrouve également en petite quantité.

Ces différentes classes de molécules confèrent des propriétés biologiques diverses à la fraction insaponifiable. La fraction insaponifiable de l'huile d'olive a largement été étudiée et a montré entre autres des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (De la Puerta et al., 2000; Perona et al., 2004). Une formulation à base d'insaponifiable d'huile d'avocat et de soja, commercialisée sous le nom de Piasclédine® a fait l'objet de nombreuses études dans le traitement de l'ostéoarthrite (Kucharz, 2003; Lippiello et al., 2008). Une étude a également montré l'intérêt de la fraction insaponifiable de l'huile de noix de coco dans un modèle *in vivo* d'hypercholestérolémie par comparaison de l'huile de noix de coco vierge extraite par voie humide à l'huile de noix de coco extraite par voie sèche classiquement appelé huile de coprah. L'huile vierge produite qui possède une teneur en insaponifiable plus importante que l'huile de coprah, a montré un effet bénéfique sur le métabolisme lipidique et le statut antioxydant dans ce modèle *in vivo* (Govindan et Rajamohan, 2009).

Les principales classes de molécules d'intérêt thérapeutique et retrouvées dans l'insaponifiable des huiles végétales sont les caroténoïdes, les phytostérols ainsi que la vitamine E qui regroupe les tocophérols et tocotriénols.

III.2 Les caroténoïdes

III.2.1 Structure et classification

Les caroténoïdes font partie de la famille des tétraterpènes et sont représentés par plus de 700 structures différentes (Britton et al., 2004). Ce sont des pigments liposolubles synthétisés par les plantes, les champignons, les bactéries et les algues ; les animaux les incorporant par la nourriture. Les caroténoïdes, tout comme les chlorophylles sont des pigments naturels qui contribuent à la couleur des huiles et sont éliminés en grande partie par le raffinage.

Les caroténoïdes dérivent du phytoène (Figure 15) qui est issu lui-même de deux molécules de géranyl-géranyl-diphosphate. Ils comprennent les carotènes qui sont des hydrocarbures, les xanthophylles comportant des fonctions oxygénées, ainsi que des produits de dégradation. C'est le grand nombre de doubles liaisons conjuguées qui leur confèrent cette coloration jaune orangée à rouge caractéristique, ainsi que leur grande sensibilité à l'oxydation. La présence de doubles liaisons permet l'isomérisation *cis-trans*, la forme *trans* est cependant la plus commune dans les aliments.

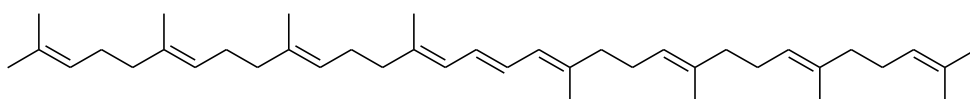


Figure 15 : Structure du phytoène

Les principaux carotènes sont le β -carotène, ses isomères α , χ et δ , et le lycopène. Les xanthophylles, molécules oxygénées, étant principalement représentées par la lutéine et la β -cryptoxanthine (Figure 16). Chez les plantes, les caroténoïdes contribuent au système photosynthétique et à la protection contre la photo-agression.

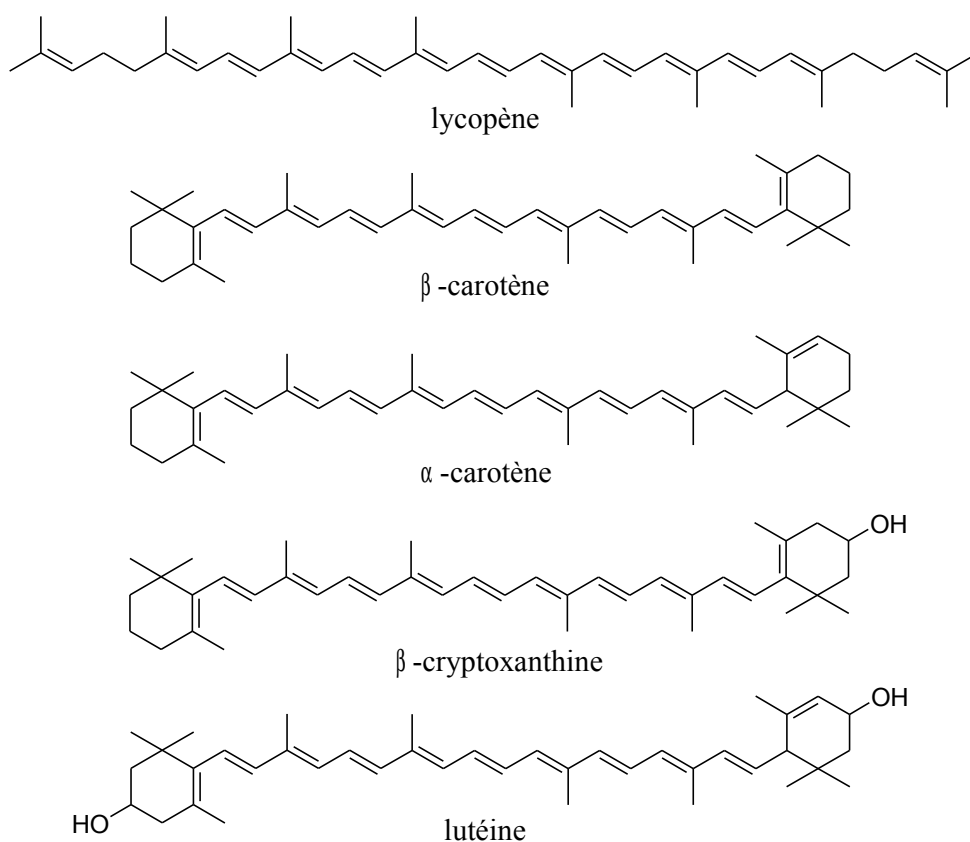


Figure 16 : Structures des principaux caroténoïdes

III.2.2 Propriétés biologiques

Certains caroténoïdes, par biotransformation en rétinol (Vitamine A), possèdent une activité pro-vitaminique A ce qui leur confère un rôle important dans la perception visuelle. Le β -carotène possède la plus grande activité pro-vitaminique suivi par l' α -carotène et la β -cryptoxanthine. Ils présentent également des propriétés antioxydantes car ils sont des puissants capteurs de radicaux libres. Ils préviennent donc de l'héliodermie et de la photo-carcinogenèse UVH induite et ont une efficacité de photo-protection et de prévention du vieillissement cutané (Bayerl, 2008).

Un grand nombre d'études épidémiologiques ont montré l'effet d'une alimentation riche en caroténoïdes sur l'incidence de plusieurs cancers et maladies cardiovasculaires (Paiva et Russell, 1999; Riccioni, 2009; Van Poppel, 1996). Cependant, des études ont montré que l'apport en β -carotène chez des patients considérés comme « hautement sensibles » comme les fumeurs entraîne une augmentation de l'incidence de cancers et d'accidents cardiovasculaires (Johnson, 2002; Omenn et al., 1996). L'effet pro-carcinogène du β -carotène serait dû à la forte production des produits d'oxydation du β -carotène induit par les ERO dont la production est augmentée chez les fumeurs (Mayne, 1996) ou par modification du catabolisme de l'acide rétinoïque (Wang et al., 1999). L'apport de caroténoïdes semble donc avoir à un niveau physiologique des effets bénéfiques sur la santé, mais également des effets délétères s'il est apporté en trop grande quantité et dans des conditions de stress oxydant important.

La biodisponibilité et le métabolisme ainsi que les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-asthmatiques des caroténoïdes sont développées ci-dessous.

III.2.2.a Biodisponibilité et métabolisme

L'apport de caroténoïdes dans notre alimentation provient aussi bien des fruits et légumes de couleur jaune à orange que des légumes verts comme les épinards. Sur plus de 700 caroténoïdes identifiés, une cinquantaine est retrouvée dans notre alimentation et seulement 6 (β -carotène, β -cryptoxanthine, α -carotène, lycopène, lutéine, zeaxanthine) représentent 95% des caroténoïdes retrouvés dans le plasma et les tissus humains, en plus de leur métabolite. L'apport en caroténoïdes varie de 10 à 20 mg/jour en fonction des pays, et celui en β -carotène principalement retrouvé dans la carotte est d'environ 5 mg/jour (Maiani et al., 2009).

Comme les autres lipides, les caroténoïdes sont absorbés au niveau intestinal. L'étape initiale importante de l'absorption est la libération des caroténoïdes par la matrice alimentaire et

l'incorporation à la phase micellaire (Krinsky et Johnson, 2005). Les caroténoïdes sont ensuite absorbés par la muqueuse de l'intestin grêle et associés aux chylomicrons pour être ensuite sécrétés dans le système lymphatique et transportés jusqu'au foie par la circulation sanguine où ils sont ensuite incorporés aux lipoprotéines. L'absorption des caroténoïdes est différente en fonction des tissus, la plupart des caroténoïdes étant retrouvés au niveau des tissus adipeux (80%) et du foie (10%), la lutéine et la zeaxanthine étant quant-à-eux majoritairement retrouvés au niveau des tissus oculaires (Borel et al., 2005).

III.2.2.b Propriétés antioxydantes

Les caroténoïdes sont de puissants piègeurs de radicaux libres et donc des inhibiteurs de la peroxydation lipidique. La capacité antioxydante des caroténoïdes varie en fonction de la structure du caroténoïde mais également en fonction du type d'ERO lui-même. La capacité de piégeage des ERO est directement liée au nombre de doubles liaisons conjuguées, mais également à la nature et position des substituants (Young et Lowe, 2001). Le lycopène de par sa structure, est le plus puissant des piègeurs de l'oxygène singulet (Krinsky, 1998). Cependant, il est difficile de transposer ces observations dans des modèles *in vivo*. La supplémentation en β -carotène dans l'alimentation a déjà montré une augmentation de la capacité antioxydante du plasma chez les femmes âgées (Meydani et al., 1994).

Depuis quelques années, de nombreuses études ont décrit à la fois des propriétés antioxydantes (Lin et al., 1998; Romanchik et al., 1997) et pro-oxydantes (Gaziano et al., 1995; Katsuura et al., 2009; Palozza, 2005) des caroténoïdes. Ce sont de puissants piègeurs de l'oxygène singulet, mais il existe une ambiguïté sur les effets bénéfiques des caroténoïdes *in vivo*. Les différences de résultats seraient liées à la dose de β -carotène utilisée et aux différences de méthodologies employées. La manière de solubiliser les caroténoïdes, l'initiation du stress oxydant, la présence d'autres antioxydants, les modèles d'études utilisés (*in vivo* et *in vitro*) ainsi que les paramètres mesurés entraîneraient une grande variation dans les effets mesurés (Krinsky et Johnson, 2005).

L'un des premiers modèles d'étude *in vitro* des propriétés antioxydantes des caroténoïdes implique l'utilisation des liposomes (Anderson et Krinsky, 1973). L'incorporation du β -carotène dans les liposomes les protège de la peroxydation lipidique induite par l'AAPH. Cependant lorsque les liposomes sont déjà pré-formés, le β -carotène n'a pas d'effet (Liebler et al., 1997). Des

modèles d'études *ex vivo* comme les LDL ou les microsomes ont également été utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des caroténoïdes.

L'effet protecteur des caroténoïdes sur la production d'ERO a également été démontré dans différents types cellulaires (Murakami et al., 2000; Liu et al., 2000). En 2002, Palozza *et al.* ont montré que le β -carotène diminuait la production d'ERO à faible concentration tandis qu'il l'augmentait à forte concentration sur des cellules HL-60 différenciées ou non (Palozza et al., 2002).

En 2006, Imamura *et al.* ont montré que le β -carotène augmentait la peroxydation lipidique *in vitro* mais atténuait l'oxydation intracellulaire, par augmentation du glutathion intracellulaire et de la transcription de la γ -glutamyl cystéine synthétase (γ -GCS) impliquée dans la synthèse du glutathion (Imamura et al., 2006). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude (Katsuura et al., 2009) qui a montré à la fois une augmentation de glutathion réduit et oxydé due à une sur-régulation de la synthèse de glutathion réduit.

III.2.2.c Propriétés anti-inflammatoires

Le β -carotène possède des effets bénéfiques sur le développement de maladies inflammatoires comme l'athérosclérose (Vivekananthan et al., 2003) et l'arthrite rhumatoïde (Heliövaara et al., 1994).

En 2005, Bai *et al.* ont montré que le β -carotène inhibait l'expression de l'iNOS, du $\text{TNF}\alpha$, de l'IL- 1β et de la COX-2, et donc la production de NO^* et des PGE_2 dans un modèle de macrophages activés au LPS. La production de ces différents médiateurs a également été inhibée dans un modèle de choc septique chez la souris. Le β -carotène bloquerait aussi l'activation de NF- κ B et réduirait la production d'ERO. Le β -carotène posséderait des propriétés anti-inflammatoires par suppression des cytokines inflammatoires et par suppression de l'activation rédox de NF- κ B (Bai et al., 2005).

En 2006, Imamura *et al.* ont montré que le β -carotène inhibait la production d'IL- 1β et d'IL-12p40 et ont proposé un mécanisme d'action passant par l'augmentation de la peroxydation lipidique (Imamura et al., 2006). L'augmentation de la peroxydation lipidique induit l'augmentation de la production de GSH par la sur-régulation de la γ -GCS, cette augmentation de GSH entraînant l'inhibition de la production des ERO et donc de l'activation de NF- κ B (Figure 17).

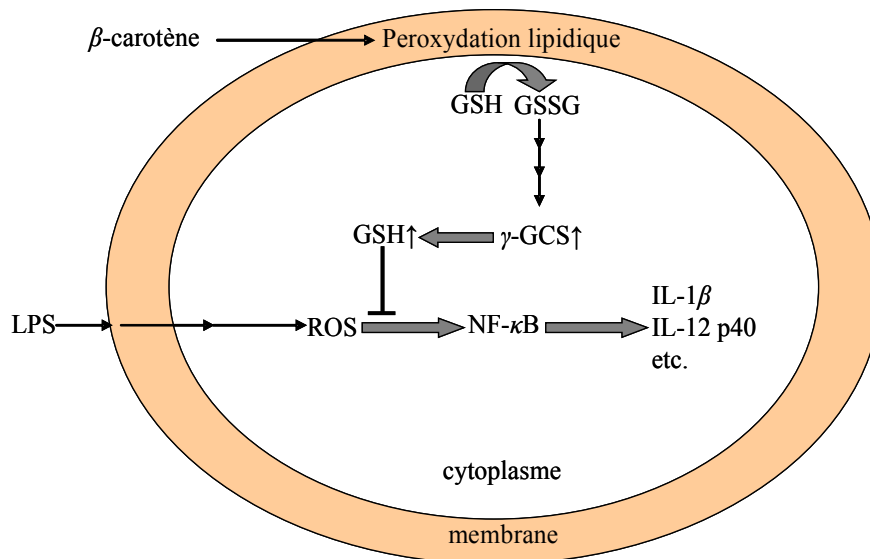


Figure 17 : Mécanisme proposé de modulation du système immunitaire des macrophages par le β -carotène (d'après Imamura et al., 2006)

L'effet du β -carotène sur les fonctions immunitaires par la modulation du statut rédox de la cellule a également été confirmé dans une autre étude qui a montré l'effet inhibiteur du β -carotène sur la transcription d'IL-1 β , -6 et -12 (Katsuura et al., 2009).

Les effets pro-oxydants du β -carotène ont également été décrits *in vitro* sur des cellules stimulées au TPA. Une concentration élevée en β -carotène (20 μ M) a montré des effets pro-inflammatoires par induction de la production d'IL-8 et de TNF α contrairement à une concentration de 2 μ M (Yeh et al., 2009). Cette étude a également montré l'effet synergique de flavonoïdes avec l'effet anti-inflammatoire du β -carotène à 2 μ M ainsi que l'effet inhibiteur des flavonoïdes sur l'effet pro-inflammatoire du β -carotène à 20 μ M. L'effet pro-inflammatoire d'une forte dose et anti-inflammatoire d'une faible dose de β -carotène a été également décrit dans un modèle animal exposé à la fumée de cigarette (Liu et al., 2000).

Les effets anti-inflammatoires des caroténoïdes et plus spécifiquement du β -carotène semblent être liés à leurs propriétés antioxydantes. L'apport trop important de β -carotène et l'état oxydatif de l'organisme semblent être responsables des effets pro-oxydants et donc pro-inflammatoires du β -carotène.

III.2.2.d Propriétés anti-asthmatiques

Les caroténoïdes ont également montré des propriétés anti-allergiques dans une étude épidémiologique (Butland et al., 1999). La combinaison d'un régime alimentaire riche en vitamine

E et en β -carotène a montré une suppression de la production d'IgE dans un modèle de souris allergiques en atténuant la réponse allergique de type I alors que le β -carotène seul n'a pas montré d'effet (Bando et al., 2004, 2003). Une autre étude a cependant montré une amélioration de la balance Th1/Th2 par l'apport de β -carotène seul dans un modèle du même type (Sato et al., 2004), l'apport d' α ou de β -carotène aurait un effet dans la prévention des allergies alimentaires (Sato et al., 2010). Par ailleurs, l'apport excessif de vitamine A a augmenté la sévérité de l'asthme induit chez la souris (Schuster et al., 2008). Le lycopène a quant à lui montré un effet inhibiteur sur l'inflammation bronchique induite par l'ovalbumine dans un modèle d'asthme (Lee et al., 2008).

III.2.3 Composition en caroténoïdes de l'huile de pulpe d'awara

L'awara est très riche en caroténoïdes (Cavalcante, 1977; Floch, 1958), l'huile de pulpe aurait une teneur en caroténoïdes allant de 110 à 218 mg/Kg d'huile (Ferreira et al., 2008; Oboh et Oderinde, 1988; Oboh, 1995). Cependant, les différents caroténoïdes présents n'ont pas encore été identifiés.

III.3 Les phytostérols

III.3.1 Structure et classification

Les phytostérols font partie de la famille des triterpènes (Lercker et Rodriguez-Estrada, 2000). La voie de synthèse des triterpènes commence par la réduction du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme-A en mévalonate. La condensation de trois unités mévalonate forme le farnésyl diphosphate, et la condensation de deux unités farnésyl diphosphate aboutit au squalène (Figure 18) constitué de 30 atomes de carbone qui est le précurseur de plus de 250 phytostérols différents (Piironen et al., 2000).

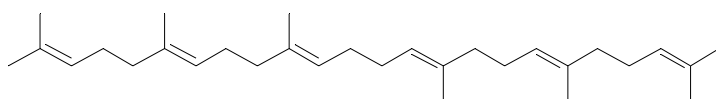


Figure 18 : Structure en C30 du squalène

On peut diviser les phytostérols en 3 groupes selon le nombre de groupement méthyle sur le carbone 4, on parle donc de 4,4-diméthylstérols (alcools triterpéniques), de 4 α -monométhylstérols (méthylstérols) et de 4-dèsméthylstérols (stérols) (Figure 19). Les alcools triterpéniques et méthylstérols sont des intermédiaires de biosynthèse permettant d'aboutir aux stérols.

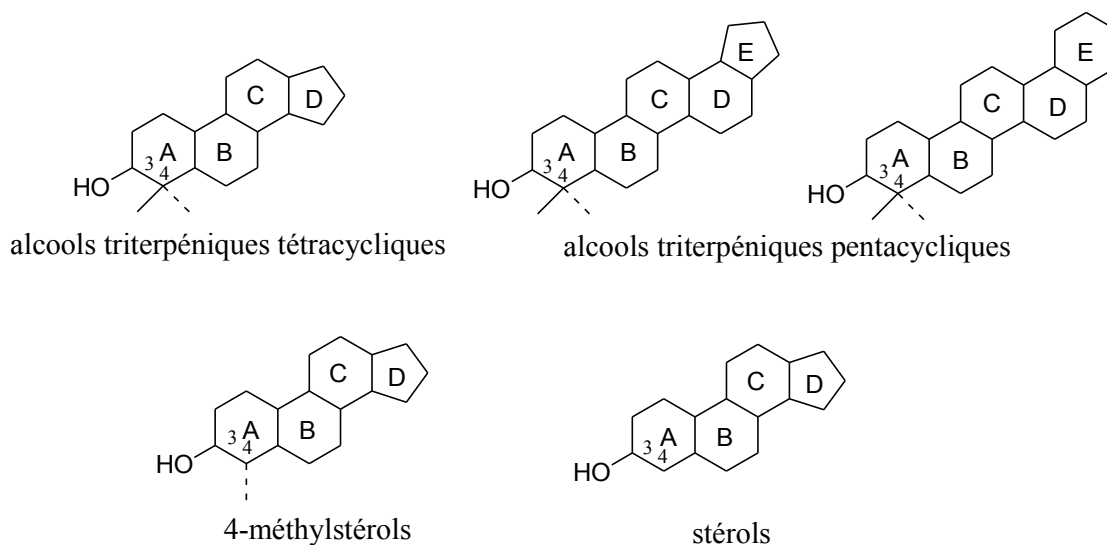


Figure 19 : Structures générales des différents phytostérols

III.3.1.a Les alcools triterpéniques

Les alcools triterpéniques sont présents chez tous les êtres vivants à l'exception des insectes et des bactéries. Très largement représentés dans le monde végétal, on les retrouve à l'état libre ou sous forme d'hétérosides ou d'esters d'acides gras. Ils dérivent de l'oxydation enzymatique du squalène en 2,3-époxy-squalène (Figure 20), qui par des réactions enzymatiques successives, va aboutir à des dérivés stables qui sont les alcools triterpéniques pentacycliques ou tétracycliques.

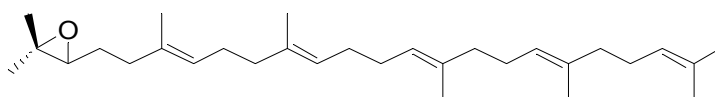
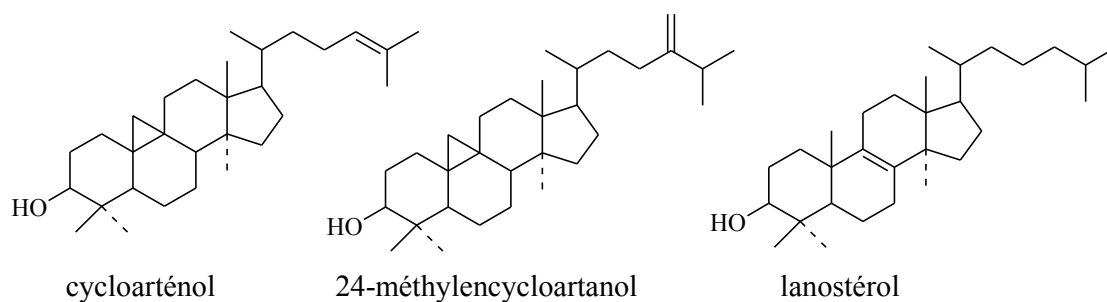
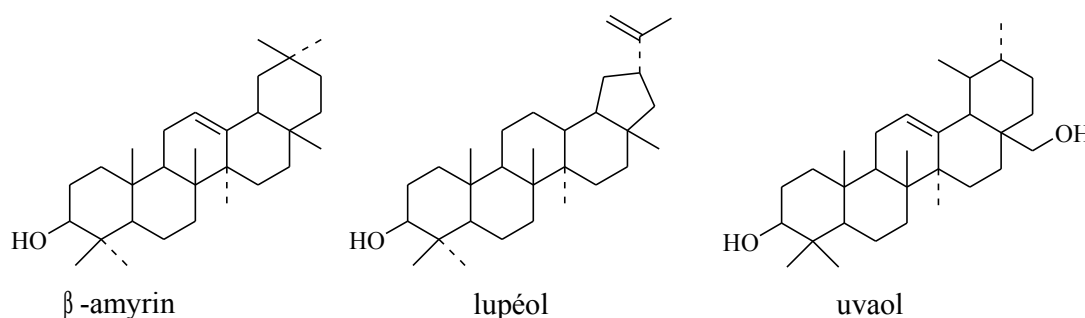
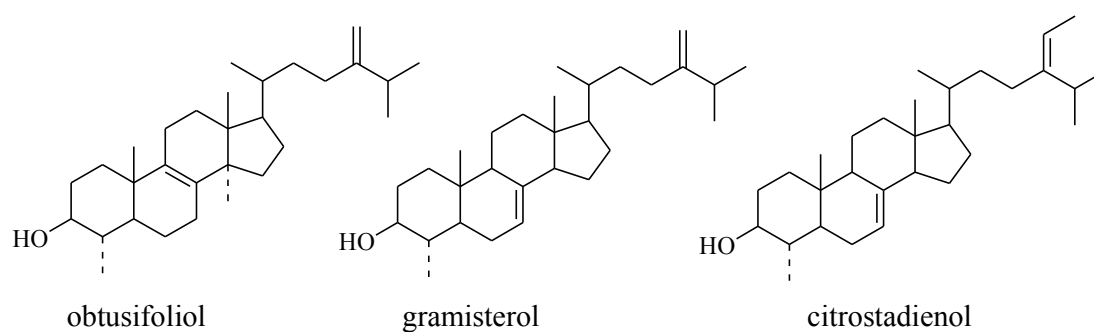


Figure 20 : Structure du 2,3-époxy-squalène

Du fait des différentes méthodes de cyclisation et de transposition qui peuvent intervenir, la stéréochimie des cycles ainsi que la position de l'insaturation et des différents substituants varient, donnant lieu à une grande diversité de squelettes carbonés. La présence sur le cycle A d'un groupement diméthyle en 4 et d'une fonction hydroxyle en 3- β sont des caractéristiques communes et essentielles. Les alcools triterpéniques tétracycliques principalement retrouvés dans le règne végétal sont le cycloarténol, le 24-méthylénecycloartanol et le lanostérol. Les alcools triterpéniques pentacycliques sont spécifiques des végétaux et les principaux retrouvés sont les α et β -amyrines, le lupéol et l'uvaol (Figure 21).

principaux alcools triterpéniques tétracycliques**principaux alcools triterpéniques pentacycliques***Figure 21 : Structures des principaux alcools triterpéniques***III.3.1.b Les 4-méthylstérois**

Les 4-méthylstérois (Figure 22) ont pour origine le cycloarténol et le 24-méthylcycloartanol et sont caractérisés par la présence d'un groupement méthyle en position 4. Ils sont présents en faible quantité dans la fraction insaponifiable des corps gras. Ils sont des intermédiaires biosynthétiques entre les alcools triterpéniques et les stérois.

*Figure 22 : Structures des principaux 4-méthylstérois*

III.3.1.c Les stérols

Les stérols sont des composés tétracycliques ne possédant pas de groupement méthyl sur le carbone 4. Dans les huiles, ils sont présents sous forme libre ou estérifiée par un acide gras et représentent 30 à 60 % de l'insaponifiable. Dans le règne végétal, le stérol majoritaire est le β -sitostérol (Figure 23).

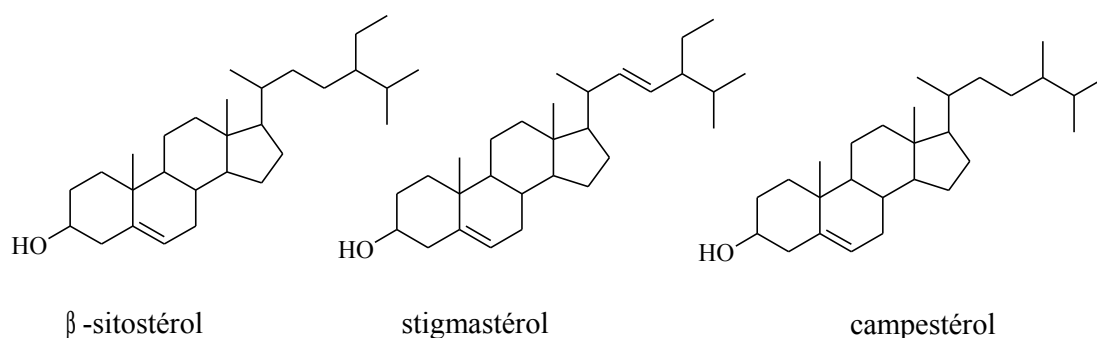


Figure 23 : Structures des principaux stérols

III.3.2 Propriétés biologiques

Les phytostérols ont une structure analogue au cholestérol et ont une même fonction de base dans la régulation de la fluidité membranaire des cellules.

Les premières études réalisées sur les phytostérols ont permis de mettre en évidence leur capacité à inhiber l'absorption du cholestérol micellaire et à interférer dans la biosynthèse endogène du cholestérol entraînant une diminution du cholestérol plasmatique (De jong et al., 2003; Ling et Jones, 1995) et donc le risque de maladies cardiovasculaires.

Les stérols et alcools triterpéniques ont également montré des activités anticancéreuses sur le cancer du colon, des poumons et de la prostate (Awad et Fink, 2000; Raicht et al., 1980; Smith-Kielland et al., 1996; Woyengo et al., 2009). Certains phytostérols ont également des propriétés anti-pyrétiques, anti-diabétiques (Lee et al., 2004) analgésiques, anthelminthiques et antimutagéniques (Villasenor et al., 2002).

De nombreuses études ont montré que les phytostérols n'avaient pas d'effets toxiques ou secondaires (Ling et Jones, 1995). Cependant certaines études décrivent des effets négatifs en diminuant la concentration plasmatique des antioxydants liposolubles (caroténoïdes et tocophérols) (De jong et al., 2003; Plat et Mensink, 2001). La modification de la concentration plasmatique de ces antioxydants liposolubles serait due à une diminution de l'incorporation

micellaire tout comme pour le cholestérol. D'autres études ont également montré qu'un taux plasmatique trop important de phytostérols augmentait les risques d'athérosclérose chez les patients atteints de phytostérolémie, maladie génétique rare due à la dérégulation de l'absorption de cholestérol et à l'accumulation de stérols (Brufau et al., 2008; Lizard, 2008).

La biodisponibilité et le métabolisme ainsi que les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-asthmiques des phytostérols sont développés ci-dessous.

III.3.2.a Biodisponibilité et métabolisme

La consommation alimentaire des phytostérols varie de 150 à 400 mg/jour et les phytostérols majoritaires de l'alimentation sont le β -sitostérol (65 %), le campestérol (30 %) et le stigmastérol (5 %) (Ling et Jones, 1995). Les plus grandes sources de phytostérols sont les huiles de plantes non raffinées, les noix et les légumes ; le raffinage et la désodorisation des huiles entraînant une réduction de la teneur en phytostérols. La teneur en phytostérols des huiles peut varier de 50-70 mg/100 g pour l'huile de palme à 700-800 mg/100 g pour l'huile de maïs (Phillips et al., 2002).

Les phytostérols sont uniquement absorbés au niveau intestinal. Après ingestion, ils sont émulsifiés comme les autres lipides par les sels biliaires sécrétés dans l'intestin et entrent donc en compétition avec le cholestérol au sein de la phase micellaire. Les phytostérols estérifiés sont alors hydrolysés tout comme le cholestérol pour être ensuite absorbés par les entérocytes par les mêmes transporteurs impliqués dans l'absorption du cholestérol (Igel et al., 2003). Dans les entérocytes, les phytostérols sont estérifiés par des acides gras et combinés au cholestérol, triacylglycérol et apolipoprotéines pour former les chylomicrons (Gylling et al., 2006). Les chylomicrons sont ensuite libérés dans le système lymphatique puis dans la circulation sanguine. Dans le foie, ils sont ensuite utilisés dans la synthèse des sels biliaires ou incorporés aux lipoprotéines à très basse densité (VLDL) qui vont être converties dans le sang en lipoprotéines à basse densité (LDL) et donc pouvoir être disponibles pour les cellules (Hamada et al., 2007).

L'absorption des phytostérols par les entérocytes est plus faible que celle du cholestérol et dépend de la structure du phytostérol. Le campestérol est fortement absorbé contrairement au β -sitostérol et au stigmastérol (Woyengo et al., 2009). 55 à 60 % du cholestérol consommé est absorbé alors que seulement 0,04 à 16 % pour les phytostérols, les différences de structures des phytostérols les rendant plus hydrophobes que le cholestérol (Brufau et al., 2008). Contrairement

aux stérols, les alcools triterpéniques comme le lupéol, l' α -amyrin et le cycloarténol ont un effet plus faible sur le métabolisme du cholestérol (Sierksma et al., 1999; Trautwein et al., 2002; Vissers et al., 2000).

III.3.2.b Régulations des enzymes antioxydantes

Les études sur les propriétés antioxydantes des phytostérols ont principalement porté sur le β -sitostérol. Ils n'ont pas de capacité antioxydante intrinsèque, mais ont montré un effet régulateur dans l'activité des enzymes antioxydantes, on parle donc d'effets antioxydants indirects.

Les premières études ont montré que le β -sitostérol avait une affinité de liaison des récepteurs aux œstrogènes dans les macrophages (Gutendorf, 2001) ; les œstrogènes jouant un rôle d'antioxydant par la stimulation des enzymes antioxydantes (Strehlow et al., 2003). L'implication des récepteurs à l'œstrogène et de la PI3-Kinase dans le mode d'action du β -sitostérol a également été décrit dans un modèle *in vitro* de cellules RAW activées au TPA. Le β -sitostérol modulerait les enzymes antioxydantes en prévenant l'oxydation du glutathion. Il augmente l'activité de la glutathion peroxydase et de la MnSOD, et inhibe l'activité de la catalase. L'expression de la MnSOD est également augmentée contrairement à la Cu-ZnSOD qui n'est pas affectée (Vivancos et Moreno, 2005).

Le β -sitostérol a, par la suite, montré une inhibition de la production d' $O_2^{\cdot-}$, d' H_2O_2 , de NO^{\cdot} et de l'expression de l'iNOS sur des cellules RAW activées au TPA. Il inhiberait la libération des ERO par modulation de l'activation de NF- κ B (Moreno, 2003). En synergie avec les polyphénols de l'huile d'olive, le β -sitostérol module également la production de peroxyde d'hydrogène, la libération d'acide arachidonique, et la synthèse de PGE_2 induites par les LDL oxydés sur des cellules RAW (Vivancos et Moreno, 2008). Le fucostérol a également montré des propriétés antioxydantes dans un modèle *in vivo* par modulation des enzymes antioxydantes (Lee et al., 2003).

III.3.2.c Propriétés anti-inflammatoires

Les stérols ont montré des propriétés anti-inflammatoire à la fois dans des modèles *in vitro* et des modèles *in vivo* (García et al., 1999; Gupta et al., 1980; Navarro et al., 2001; Yasukawa et al., 1996). Ils agiraient sur le système immunitaire par diminution de la réponse inflammatoire, en inhibant la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, $TNF\alpha$) (Bouic et Lamprecht, 1999),

ainsi qu'en favorisant la réponse Th1 et donc en rétablissant l'équilibre Th1/Th2 (infection, allergie, maladies auto-immunes) (Bouic et al., 1996).

Le β -sitostérol stimule à un niveau physiologique la libération de PGI_2 à partir de cellules musculaires lisses vasculaires de rat (Awad et al., 2001), les PGI_2 possédant des activités de vasodilatation, antiagrégant plaquettaire et anti-inflammatoire. Cependant, en réponse à l'activation des macrophages P388D₁/MAB au LPS, les phytostérols inhibent significativement la libération de PGE_2 et PGI_2 sans affecter l'expression de la COX-2 et de la cPLA₂, le β -sitostérol ayant un effet plus important que le campestérol (Awad, 2004). Une autre étude a également montré un effet inhibiteur du β -sitostérol sur la production de PGE_2 et de LTB_4 mais avec un effet sur l'expression de la COX-2 sur des cellules RAW activées au TPA en agissant par modulation de l'activation de NF- κ B (Moreno, 2003).

Le β -sitostérol a également montré des propriétés immunomodulatrices sur la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires dans des cellules mononucléées du sang périphérique de patients atteints de sclérose en plaques en inhibant la production de $\text{TNF}\alpha$, d'IL-12 et IL-5. Le β -sitostérol a augmenté la production d'IL-10 seulement chez les sujets sains (Desai et al., 2009). Une autre étude a montré l'association entre les effets anti-athérogéniques de la consommation de phytostérols et la réduction de cytokines pro-inflammatoires chez des souris apoE^{-/-} (Nashed et al., 2005). Le stigmastérol inhibe plusieurs médiateurs pro-inflammatoires impliqués dans la dégradation du cartilage induite dans l'ostéoarthrite en partie par l'inhibition de la voie du NF- κ B (Gabay et al., 2010).

Les propriétés anti-inflammatoires du β -sitostérol ont également été démontrées dans des cellules endothéliales aortiques humaines (Loizou et al., 2010). Le campestérol, le β -sitostérol et le sitostanol inhibent la production d'IL-12 dans des cellules Jurkat T humaines. Ce mécanisme ne passerait pas par l'inhibition de la protéine kinase C mais plutôt par une modulation de l'AMPc ou du calcium (Aherne et O'Brien, 2008).

Les alcools triterpéniques ont également montré des propriétés anti-inflammatoires importantes (Akihisa et al., 1996). Le cycloarténol et le 24-méthylencycloartanol ont montré une forte inhibition de l'inflammation dans des modèles d'inflammation *in vivo* (Ahumada et al., 1997; Akihisa et al., 2000). Le lupéol a également été très étudié pour ses propriétés anti-inflammatoires et anti-cancéreuses (Saleem, 2009).

Le β -sitostérol a montré une inhibition de l'inflammation bronchique induite par l'ovalbumine dans un modèle de souris sensibilisées (Yuk et al., 2007).

III.3.3 Composition en phytostérols de l'huile de pulpe d'awara

Les stérols identifiés dans l'huile de pulpe d'awara sont principalement du campestérol, du stigmastérol, du β -sitostérol et du fucostérol, le β -sitostérol étant le stérol largement majoritaire (Tableau 4) (Bereau, 2001; Chaik, 2003; Lubrano et al., 1994).

Tableau 4 : Composition en stérols de l'huile de pulpe d'awara (Bereau, 2001 ; Chaik, 2003 ; Lubrano et al., 1994)

Stérols	Concentration (mg/Kg d'huile de pulpe)
Cholestérol	traces
Campestérol	60-80
Stigmastérol	40-62
Sitostérol	766-1 020
fucostérol	196-260
Total	1 026-1 412

Les alcools triterpéniques identifiés dans l'huile de pulpe d'awara sont principalement le cycloarténol et le 24-méthylèncycloartanol (Tableau 5) (Chaik, 2003). Cependant, très peu de publications ont été réalisées sur la composition en alcools triterpéniques de l'huile de pulpe d'awara, les données présentées ici étant issues de thèses scientifiques. Le cycloarténol et le 24-méthylèncycloartanol ont été également identifiés dans l'huile d'amande d'awara (Bereau et al., 2003).

Tableau 5 : Composition en alcools triterpéniques de l'huile de pulpe d'awara (Chaik, 2003)

Alcools triterpéniques	Concentration (mg/Kg d'huile de pulpe)
Lanosta-8,25-dièn-3 β -ol	62-78
Cycloarténol	836-912
24-méthylèncycloartanol	107-128
Total	1 005-1 118

III.4 Les tocophérols et tocotriénols

III.4.1 Structure et classification

Les tocophérols et tocotriénols sont des substances aromatiques à noyau chromane regroupés sous le terme de tocochromanols et qui correspondent à la vitamine E (Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996). Les tocophérols et tocotriénols sont des molécules amphiphiles, la chaîne isoprénique est lipophile alors que le noyau chromane est hydrophile. Le nombre et la position des groupements méthyles sur le noyau chromane permettent la différenciation de 4 isomères (α , β , γ , δ) pour les tocophérols ainsi que pour les tocotriénols, ces deux classes ne différant que par la présence de trois insaturations sur la chaîne polyisoprénique pour les tocotriénols (Figure 24). Les tocophérols sont uniquement synthétisés par les organismes photosynthétiques (Colombo, 2010).

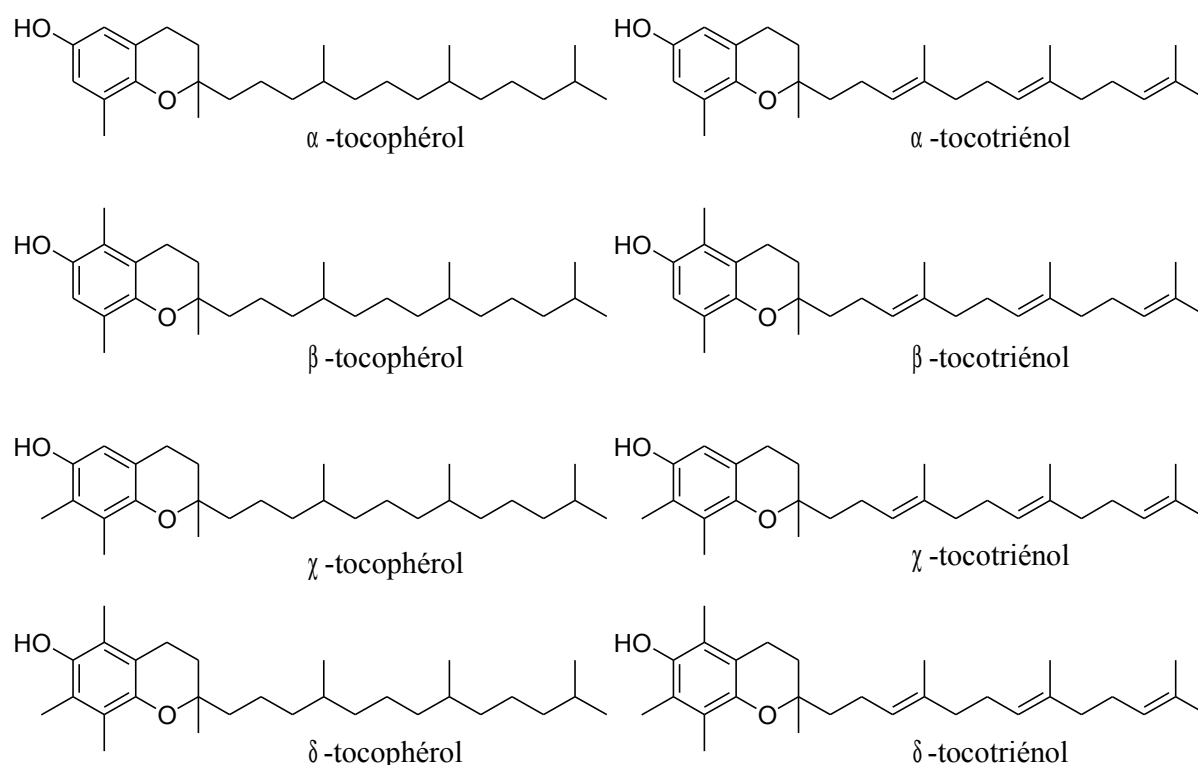


Figure 24 : Structures des tocophérols et tocotriénols

III.4.2 Propriétés biologiques

Les tocochromanols ont des propriétés antioxydantes avérées. C'est l' α -tocophérol qui est le tocochromanol le plus étudié, les tocotriénols possèdent cependant des propriétés antioxydantes,

neuroprotectrices, anti-cancéreuses et de diminution du taux de cholestérol plus importantes que les tocophérols (Sen et al., 2007; Suzuki et al., 1993).

III.4.2.a Métabolisme et biodisponibilité

La vitamine E est une vitamine liposoluble indispensable qui est apportée par l'alimentation et stockée par l'organisme. Les plus importantes sources sont les huiles végétales, les fruits à coque, les germes de blé, d'avoine et de soja ainsi que le jaune d'œuf, les margarines, le fromage. Les tocophérols et tocotriénols se retrouvent en quantité notable dans les huiles végétales telles que le tournesol, le maïs, le soja ou le colza (200 à 1 200 mg/kg d'huile végétale brute).

Les tocophérols et tocotriénols présentent le même métabolisme que les lipides en passant par la formation de micelles. La vitamine E est absorbée depuis la lumière intestinale par transport facilité (Reboul et al., 2006; Rigotti, 2007) vers les entérocytes ; elle est ensuite incorporée au sein des chylomicrons qui sont transportés par la voie lymphatique et déversés dans la circulation sanguine. Ils sont ensuite transformés en chylomicrons résiduels qui sont incorporés aux lipoprotéines circulantes (VLDL et LDL) et aux tissus. L' α -tocophérol est préférentiellement incorporé aux VLDL, les autres tocophérols et tocotriénols ne sont pas stockés mais métabolisés et éliminés (Singh et al., 2005).

III.4.2.b Propriétés antioxydantes

Les tocophérols et tocotriénols sont les antioxydants lipophiles les plus efficaces vis-à-vis de l'oxydation des acides gras poly-insaturés. En stabilisant par résonance l'électron célibataire des radicaux libres, ils forment ainsi des espèces neutres et inoffensives pour l'organisme. Ils ont un rôle de protection des membranes par limitation de la peroxidation lipidique et auraient donc un rôle protecteur dans un grand nombre de pathologies liées au stress oxydant. L' α -tocophérol est le tocochromanol qui possède le plus grand pouvoir antioxydant, cette différence est due à la gêne stérique induite par les substituants du cycle aromatique (Colombo, 2010; Traber et Atkinson, 2007).

Les tocotriénols possèderaient des propriétés de protection vis-à-vis des dommages causés à l'ADN (Chin et al., 2008). La vitamine E a montré un effet inhibiteur sur la production d'ERO par les leucocytes (Devaraj et Jialal, 1999) et de prévention de l'oxydation des LDL (Arrol et al., 2000). De par ses propriétés antioxydantes, la vitamine E aurait un rôle important dans la limitation des dommages tissulaires, et donc permettrait un meilleur fonctionnement du système

immunitaire. Cependant, des études épidémiologiques récentes ont montré que l'utilisation de fortes doses de vitamine E (supérieure à 400 IU/jour) était associée à une augmentation de la mortalité (Miller et al., 2005; Soni et al., 2010). Ainsi, la consommation de fruits et légumes riches en vitamine E a donc été recommandé plutôt qu'une supplémentation en vitamine E dans la prévention du cancer ou des maladies cardiovasculaires (Saremi et Arora, 2010).

III.4.2.c Propriétés anti-inflammatoires

La vitamine E a montré des effets anti-inflammatoires dans des pathologies chroniques comme l'athérosclérose (Devaraj et Jialal, 1998; Singh et Devaraj, 2007; Verlangieri et Bush, 1992) ou l'arthrite rhumatoïde (De Bandt et al., 2002).

L'un des mécanismes d'action de la vitamine E sur les processus inflammatoires provient de son pouvoir antioxydant. En effet, la vitamine E inhibe la production ainsi que les dommages causés par les ERO, et prévient également de l'activation des processus inflammatoire induit par les ERO.

L' α -tocophérol inhibe l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Glauert, 2007) et la protéine kinase C (Rimbach et al., 2002). Certaines formes de la vitamine E inhiberaient les enzymes impliquées dans la formation des éicosanoïdes (COX-2, 5-LOX) (Zingg et Azzi, 2004). Le γ -tocophérol inhibe la production d'éicosanoïdes par inhibition de l'activité des COX, activité que ne semble pas posséder l' α -tocophérol (Jiang et al., 2000; Jiang et Ames, 2003). Il inhibe cependant la production d'IL-1 et de TNF α par inhibition de la 5-lipoxygénase (Devaraj et Jialal, 1999, 2005). La vitamine E induirait également la libération d'acide arachidonique par une augmentation de l'activité et de l'expression de la PLA₂ (Wu et al., 2005).

La vitamine E semble jouer un rôle dans l'expression de nombreux gènes, mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore bien élucidés. Le mécanisme d'action de la vitamine E sur l'inhibition de l'activation de NF- κ B peut être issu d'une diminution du stress oxydant et/ou d'autres fonctions non antioxydantes de la vitamine E.

III.4.2.d Propriétés anti-asthmatiques

L' α -tocophérol, par la modification de la voie des leucotriènes, a montré un effet bénéfique dans l'asthme et les maladies allergiques (Centanni et al., 2001). Le γ -tocophérol a montré un rôle dans la prévention de l'infiltrât éosinophile et l'hypersécrétion de mucus dans des modèles

expérimentaux d'asthme et de rhinite allergique (Jiang et Ames, 2003; Wagner et al., 2008). Plusieurs études récentes ont également montré les effets bénéfiques de la vitamine E dans des modèles murins d'asthme par diminution de l'hyperréactivité bronchique, de la réponse Th2 et donc de l'inflammation bronchique (Mabalirajan et al., 2009; Okamoto et al., 2006). Une autre étude n'a cependant pas montré d'effet bénéfique de l' α -tocophérol dans un modèle d'asthme similaire (Suchankova et al., 2006).

Une étude épidémiologique récente a mis en évidence l'association d'une diminution des défenses antioxydantes circulantes avec la sévérité de la maladie chez des patients asthmatiques (Wood et Gibson, 2010), les patients atteints d'asthme sévère ayant un taux réduit d' α -tocophérol. Une diminution du taux d' α -tocophérol pendant les crises et également au cours des phases de rémission dans les sérums de 14 enfants atteints d'asthme a également été décrite (Kalayci et al., 2000). Dans un modèle *in vivo*, une déficience sévère en vitamine E a été associée à l'aggravation des lésions pulmonaires liées au stress oxydatif et à l'inflammation (Yamaoka et al., 2008). A l'inverse, une supplémentation en γ -tocophérol chez des patients asthmatiques a montré un effet bénéfique sur le stress oxydatif systémique (Wiser et al., 2008).

III.4.3 Composition en tocophérols de l'huile de pulpe d'awara

La teneur en tocophérols de l'huile de pulpe est de 41 à 50 mg/Kg. L' α -tocophérol représente jusqu'à 96 % des tocophérols, les isomères β et γ étant très faiblement retrouvés (Bereau, 2001; Chaik, 2003; Lubrano et al., 1994).

TRAVAUX DE LA THESE

Matériels et Méthodes

I Le matériel végétal

Les fruits d'awara proviennent de la station Combi du CIRAD (Sinnamary) de Guyane Française (mars 2008) et ont été conservés à -20 °C pour éviter les dégradations enzymatiques.

La pulpe des fruits est séparée manuellement de la noix, et celle-ci est broyée sous azote liquide pour obtenir une poudre fine. Les fruits sont pesés avant utilisation, ainsi que la poudre de pulpe obtenue pour permettre de déterminer le pourcentage moyen de pulpe dans un fruit.

II Préparation des échantillons

II.1 Extraction de l'huile de pulpe

L'extraction par soxhlet est une technique d'extraction qui nécessite peu de solvant par rapport à des extractions manuelles successives, et permet un gain de temps. Cependant, il est nécessaire de réaliser plusieurs extractions pour obtenir une quantité suffisante d'huile. De plus, l'extraction à chaud peut dégrader certaines substances chimiques telles que les caroténoïdes.

Pour une extraction soxhlet nous avons utilisé environ 200 g de poudre, et l'huile de pulpe est extraite à l'hexane pendant 4 heures. Après séchage sur sulfate de sodium anhydre, le solvant d'extraction est évaporé par distillation sous vide à 30 °C. L'huile brute obtenue est pesée pour déterminer le rendement en huile et est conservée à -20 °C jusqu'à utilisation. Plusieurs extractions ont été réalisées pour obtenir une quantité suffisante d'huile permettant de réaliser les différentes analyses sur un échantillon homogène.

II.2 Obtention de l'extrait insaponifiable brut d'huile de pulpe

La saponification est une réaction d'hydrolyse basique qui permet de transformer un ester en un ion carboxylate et un alcool. Elle permet ici de transformer le corps gras (tri-glycérides) en savon qui se retrouve donc soluble dans la phase aqueuse, et donc d'extraire par un solvant apolaire les composés non saponifiables.

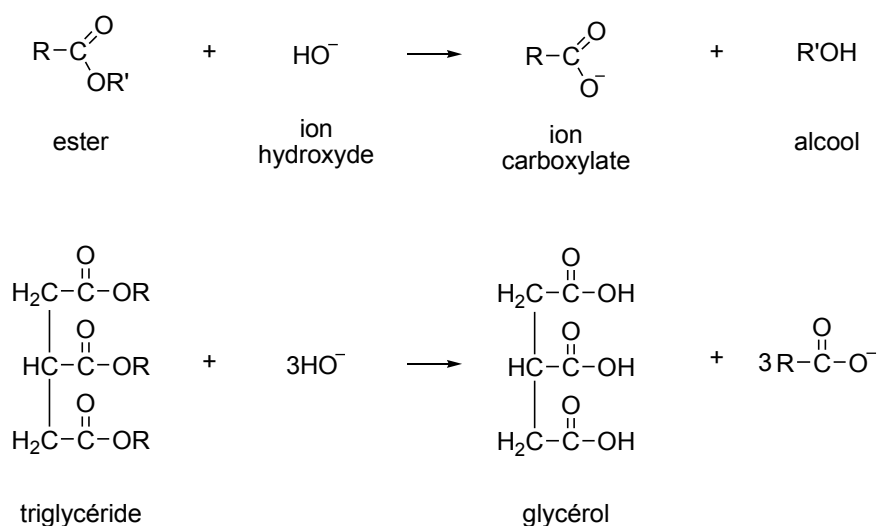


Figure 25 : La réaction de saponification appliquée à la synthèse de savon

Brièvement, 10 g d'huile sont saponifiés à reflux dans 50 mL de potasse methanolique 2 M pendant 1 heure. Lorsque le mélange revient à température ambiante, 100 mL d'eau distillée sont ajoutés. La phase aqueuse est lavée 3 fois par 50 mL d'hexane. La phase hexanique est récoltée, lavée à l'eau distillée, séchée au sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée à sec. L'extrait insaponifiable ainsi obtenu est pesé pour déterminer le pourcentage d'insaponifiable dans l'huile. Plusieurs saponifications sont réalisées pour obtenir une quantité suffisante de matière afin de réaliser les différentes analyses sur un échantillon homogène. L'extrait insaponifiable obtenu a été aliquoté (20 mg) et conservé sous azote à -20 °C.

II.3 Obtention de la fraction insaponifiable

Les tests de culture cellulaire ont été réalisés avec la fraction insaponifiable soluble dans l'éthanol de l'extrait insaponifiable brut. 20 mg de l'extrait insaponifiable sont extemporanément solubilisés dans 500 μL d'éthanol et filtrés sur filtre 0,45 μm pour obtenir la fraction insaponifiable. Pour les tests en culture cellulaire, la plus forte concentration utilisée est de 40 $\mu\text{g/mL}$ ce qui correspond à un pourcentage d'éthanol inférieur à 0,2 % dans le puits.

III Analyses chimiques

III.1 Détermination de la composition en acides gras de l'huile

III.1.1 Préparation des esters méthyliques

Les esters méthyliques ont été préparés selon la Norme Française NF T60-233, 1977. Dans un ballon de 50 mL, l'huile de pulpe (2 à 3 gouttes) est diluée dans 3 mL d'une solution de méthylate de sodium à 0,05 M contenant de la phénolphthaléine, et est chauffée à reflux pendant 10 minutes. Puis, 3 mL d'une solution de méthanol chlorhydrique (préparée avec 50 mL de chlorure d'acétyle et 625 mL de méthanol) sont ajoutés jusqu'à la décoloration de la phénolphthaléine. La solution est à nouveau chauffée à reflux pendant 10 minutes. Après retour à température ambiante du mélange, 10 mL d'eau distillée sont rajoutés puis la phase organique contenant les esters méthyliques est extraite par 8 mL d'hexane, séchée sur sulfate de sodium anhydre et filtrée pour être injectée en chromatographie gazeuse (CG).

III.1.2 Analyse des esters méthyliques par CG

L'analyse des esters méthyliques est réalisée sur un appareil CG Agilent 6890 (Bios Analytique, France) avec une colonne capillaire Supelcowax 10 (SGE, Courtaboeuf, France) ayant les caractéristiques suivantes : longueur de 30 m, diamètre interne de 0,25 mm, épaisseur du film de 0,25 μm . Les conditions chromatographiques étaient :

- Gaz vecteur : hélium avec un débit de 1 mL/min, et un split ratio de 1/100.
- Température de l'injecteur : 250 °C
- Détecteur à ionisation de flamme à 270 °C
- Programmation du four : 130 °C pendant 2 minutes, de 130 à 225 °C en 4 °C/minute, puis 225 °C pendant 7 minutes

Les esters méthyliques ont été identifiés par comparaison avec des standards commerciaux d'esters méthyliques (Sigma-Aldrich, France).

III.2 Détermination de l'acidité de l'huile

L'acidité d'un corps gras mesure le pourcentage d'acides gras libres contenu dans celui-ci (NF T60-204, 1985). Il est exprimé conventionnellement par le pourcentage de l'acide gras libre le plus important contenu dans le corps gras. On exprimera donc le résultat en pourcentage d'acide oléique. Cet indice est utilisé pour déterminer la qualité de l'huile, les acides gras libres étant responsables de l'oxydation de l'huile et de son goût désagréable de savon.

L'huile de pulpe (2 g) est mise en solution dans 40 mL d'un mélange éthanol/oxyde diéthylique (1/1) ; les acides gras libres sont titrés à l'aide d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (0,1 N) en présence de phénolphtaléine (3 gouttes d'une solution à 20 g/L dans l'éthanol).

III.3 Détermination de l'indice de peroxyde de l'huile

L'indice de peroxyde d'un corps gras mesure son état d'oxydation qui correspond à l'action de l'oxygène sur les doubles liaisons des acides gras (NF T60-220, 1968). C'est ce phénomène d'oxydation qui est responsable de l'odeur rance des corps gras. Il est exprimé en milliéquivalents d'oxygène actif par Kg de matière grasse pouvant oxyder l'iodure de potassium en présence d'acide acétique et de chloroforme. L'iode libéré est titré en retour par une solution de thiosulfate de sodium.

L'huile de pulpe (2 g) est mise en solution dans 10 mL de chloroforme, 15 mL d'acide acétique et 1 mL d'iodure de potassium (solution aqueuse saturée) sont rajoutés. Le mélange est ensuite fermé, agité pendant 1 minute, puis laissé à l'obscurité pendant 5 minutes. 75 mL d'eau ultrapure sont ajoutés au mélange. Puis l'iode libéré est titré en présence de thiodène de sodium (indicateur colorimétrique) par une solution de thiosulfate de sodium (0,002 N).

III.4 Dosage des tocophérols

Le dosage des tocophérols a été réalisé selon la méthode AFNOR ISO 9936 (AFNOR, 1997), par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase normale par une détection en fluorimétrie. L'appareil CLHP (Thermo-Finnigan, France) est équipé d'une pompe quaternaire P1000XR, d'un passeur d'échantillons AS1000, d'une valve d'injection 6 voies, d'un détecteur spectrofluorimétrique FL3000 et d'un logiciel de traitement des données PC 100. La longueur d'onde d'excitation est de 290 nm, et la longueur d'onde d'émission est de 330 nm. La

séparation a été réalisée sur une colonne ACE 5 SIL d'une longueur de 25 cm, d'un diamètre interne de 4,6 mm, et d'une porosité de 5 μ m, par une phase mobile composée d'un mélange hexane/dioxane (97/3) à un débit de 1 mL/min. Le volume d'injection était de 20 μ L. L'identification a été réalisée à l'aide de standards de tocophérols (α , β , γ et δ tocophérol, VWR International SAS, Fontenay sous Bois, France), et le dosage par des gammes étalons externes (gamme de linéarité: de 1 à 30 μ g/mL). Le dosage des tocophérols a été réalisé sur l'huile, l'extrait insaponifiable brut et la fraction insaponifiable.

III.5 Dosage des caroténoïdes totaux

Les échantillons sont solubilisés dans l'hexane, puis les dilutions sont réalisées dans l'éther de pétrole. La concentration de chaque caroténoïde est exprimée en équivalent *all-trans- β -carotène* en utilisant le coefficient d'extinction molaire du *all-trans- β -carotène* à 450 nm dans l'éther de pétrole ($\epsilon=138900$) (Britton *et al.*, 2004). Le dosage des caroténoïdes totaux a été réalisé sur l'huile, l'extrait insaponifiable brut et la fraction insaponifiable.

III.6 Identification et dosage des caroténoïdes par CLHP-DAD-SM

L'analyse des caroténoïdes a été réalisée sur un appareil CLHP Surveyor plus équipé d'un détecteur à barrette de diodes (DAD pour *Diode Array Detection*) modèle UV6000LP, de pompes quaternaires P4000, d'un injecteur automatique AS3000 et couplé à un spectromètre de masse (SM) LCQ équipé d'une source d'ionisation APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) (THERMO ELECTRON, San José, USA) en mode positif. La séparation a été réalisée sur une colonne C30 de longueur 25 cm, de diamètre interne 4,6 mm et d'une porosité de 5 μ m (YMC EUROP, GmbH, Dinslaken, Germany). Les phases mobiles étaient de l'eau pour l'éluant A, du méthanol pour l'éluant B et du méthyl-tert-butyl éther (MTBE) pour l'éluant C. Le débit était de 1 mL/min et la température de colonne de 25 °C. Le gradient de programmation était : 0 min, 40 % A/60 % B ; 0-5 min, 20 % A/80 % B ; 5-10 min, 4 % A/81 % B/15 % C ; 10-60 min, 4 % A/11 % B/85 % C ; 60-71 min, 100 % B ; 71-72 min, retour aux conditions initiales pour rééquilibration. Le volume d'injection était de 20 μ L et la détection a été réalisée entre 250 et 600 nm. Les paramètres de détection sont les suivants : courant de décharge de l'électrode 5 μ A, température de la source, 450 °C, température du capillaire, 350 °C, voltage du capillaire, 10 V et l'azote est utilisé comme gaz de nébulisation à un débit de 80 mL/min.

L'identification des caroténoïdes a été réalisée en comparant les données expérimentales aux temps de rétention, aux spectres d'absorption, au ratio % III/II et aux spectres de masse donnés dans la littérature (Britton *et al.*, 2004 ; De Rosso et Mercadante, 2007 ; Mertz *et al.*, 2010).

La quantification des caroténoïdes a été réalisée sur un appareil CLHP Agilent 1100 System (Massy, France). La colonne et les conditions de gradient étaient les mêmes que celles utilisées pour la détection en spectrométrie de masse. Le volume d'injection était de 20 μ L. L'absorbance a été suivie à 290, 350, 400 et 450 nm à l'aide d'un détecteur à barrettes de diode Agilent 1100. Une courbe de calibration a été réalisée avec du *all-trans- β -carotène* (gamme de linéarité: de 0,7 à 29,2 mg/L; Extrasynthese, Genay, France), les concentrations des solutions de *all-trans- β -carotène* utilisées ont été calculées par spectrophotométrie à 450 nm en utilisant le coefficient d'extinction molaire ($\epsilon=138900$) (Britton *et al.*, 2004). La concentration de chaque caroténoïde est exprimée en équivalent β -carotène à 450 nm. Le dosage des caroténoïdes par CLHP-DAD a été réalisé sur l'extrait insaponifiable brut et la fraction insaponifiable.

III.7 Identification et dosage des phytostérols par CG-SM

Les analyses en CG-SM ont été réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890 équipé d'une colonne DB1 d'une longueur de 30 m, d'un diamètre interne de 0,25 mm et d'une épaisseur de film de 0,25 mm qui permet l'analyse directe des phytostérols sans dérivation. La détection a été réalisée par un spectromètre de masse Agilent 5973N en mode d'ionisation par impact électronique, avec une température de source de 250 °C et une énergie d'ionisation de 70 eV. Les conditions chromatographiques étaient :

- Gaz vecteur : hélium avec un débit de 1 mL/min, et un split ratio de 1/80
- Température de l'injecteur : 290 °C
- Volume d'injection : 1 μ L
- Programmation du four :
 - 250 °C pendant 5 minutes
 - 250 °C à 270 °C en 1 °C/min
 - 270 °C à 290 °C en 10 °C/min
 - 290 °C pendant 10 minutes

L'identification des composés a été réalisée par comparaison de leur spectre de masse avec la base de données NIST (*National Institute of Standards and Technology*) et avec les données de la littérature, ainsi que par comparaison de leur temps de rétention avec des standards. Les standards stigmastérol, campestérol et β -sitostérol sont de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) ; le cycloarténol est d'Extrasynthèse (Genay, France). La quantification a été réalisée par étalonnage interne par ajout de 5α -cholestane- 3β -ol (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) avant la saponification pour le dosage dans l'huile de pulpe et l'extrait insaponifiable ($50\mu\text{g}$ de 5α -cholestane- 3β -ol ajouté par g d'huile), et après la filtration pour le dosage dans la fraction insaponifiable ($0,1\text{mg}$ de 5α -cholestane- 3β -ol ajouté par mg de fraction insaponifiable).

IV Étude des propriétés antioxydantes

IV.1 Méthode du DPPH *in vitro*

La capacité antioxydante à piéger le radical cation DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) a été mesurée selon la méthode décrite par Liu *et al.* (2008) avec quelques modifications. Une solution de radical DPPH ($0,5\text{ mM}$) a été préparée dans l'éthanol. Brièvement, $150\mu\text{L}$ d'échantillon sont mélangés avec $150\mu\text{L}$ de la solution de DPPH. Pour chaque échantillon, un blanc est réalisé dans le solvant de solubilisation. Après 1 heure d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est lue à 540 nm . Le pourcentage de piégeage des radicaux libres est calculé en utilisant l'équation suivante :

$\% \text{ESC} = 100 - [(DO_{\text{éch}} - DO_{\text{blanc}}) \times 100 / DO_{\text{control}}]$ où $DO_{\text{éch}}$ est l'absorbance de l'échantillon (échantillon plus la solution de DPPH), DO_{blanc} est l'absorbance du blanc (échantillon plus éthanol), DO_{control} est l'absorbance du control (solution de DPPH plus éthanol). La concentration de piégeage à 50% (SC_{50}) a été utilisée pour comparer l'activité de piégeage du radical avec un standard α -tocophérol. La mesure de la capacité antioxydante *in vitro* a été réalisé sur l'huile et la fraction insaponifiable.

IV.2 Méthode du SNP *in vitro*

La capacité de la fraction insaponifiable à piéger le NO^{\bullet} est évaluée en mesurant le taux de nitrites présents après décomposition photochimique du sodium nitroprussiate (SNP) en absence

et en présence de la fraction insaponifiable (Meng *et al.*, 2008). Pour cela, 50 μL de SNP à 2,5 μM sont incubés en absence ou en présence de 50 μL de différentes concentrations de la fraction insaponifiable. L'incubation est réalisée pendant 1 heure sous une lampe à lumière solaire afin de permettre la décomposition photochimique du SNP. Après incubation, le taux de nitrites est déterminé par le réactif de Griess (Boudard *et al.*, 1994). La méthode de Griess est une réaction de diazotation en deux étapes : les nitrites forment un sel de diazonium avec l'acide sulfanilique qui est ensuite couplé avec une amine (N-naphtyléthylène diamine) pour conduire à un composé azoïque coloré ayant un maximum d'absorption à 540 nm. Brièvement, 100 μL de réactif de Griess préparé extemporanément (0,1 % de naphthyléthylènediamide dihydrochloride dans H_2O et 1 % de sulfanilamide dans 5 % H_2PO_4 concentré ; 1/1) sont ajoutés au mélange. Après incubation pendant 10 minutes à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance à 550 nm est mesurée par un lecteur de microplaque (Molecular Devices). La concentration en nitrites est déterminée par comparaison avec une courbe étalon obtenue avec une solution stock de NaNO_2 .

V Étude des propriétés anti-inflammatoires *in vitro*

V.1 Mesure de l'activité des COX

La mesure de l'inhibition de l'activité des COX est évaluée grâce à un kit de dosage (*COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit*, Cayman chemical, SpiBio, France) qui mesure la production de prostaglandines formées lors de la réaction des COX avec leur substrat : l'acide arachidonique. Les COX-1 et -2 sont mises en présence de la fraction insaponifiable à différentes doses ou d'indométacine (AINS de référence) pendant 5 minutes à 37 °C en présence d'hème. L'ajout d'acide arachidonique entraîne la formation de prostaglandines PGH_2 . Au bout de 2 minutes, la réaction est arrêtée par ajout d'acide chlorhydrique, et les PGH_2 produites sont transformées en $\text{PGF}_{2\alpha}$ par l'ajout de SnCl_2 . Le taux de $\text{PGF}_{2\alpha}$ est ensuite mesuré par colorimétrie à 405 nm.

V.2 Activités *in vitro* sur une lignée de macrophages murins

V.2.1 Lignée cellulaire

La lignée cellulaire de macrophages murins J774 a été obtenue par l'*American Type Culture Collection* (ATCC, TIB67, Rockville, MD). Les cellules sont cultivées en boîtes stériles dans un milieu RPMI 1640 avec Glutamax® supplémenté par 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal décomplémenté (Gibco), 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (milieu RPMI complet), puis incubées à 37 °C, 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité. Les cellules sont cultivées jusqu'à la confluence. Le dénombrement cellulaire et la viabilité cellulaire sont déterminés microscopiquement par l'utilisation de la méthode d'exclusion au bleu trypan. Les cellules utilisées pour les expériences ont une viabilité ≥ 95 %.

V.2.2 Mesure de la viabilité cellulaire

La mesure de la viabilité cellulaire est réalisée en utilisant le kit *CellTiter 96 Aqueous nonradioactive cell proliferation assay* (Proméga, France), constitué d'un sel de tétrazolium : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulphophényl)-2H-tétrazolium (MTS), et d'un réactif accepteur d'électrons : la phénazine méthosulfate (PMS). Le MTS est réduit en formazan par les déshydrogénases retrouvées dans les cellules métaboliquement actives. Le formazan produit a une absorbance mesurable à 490 nm.

Les cellules (10⁵/puits) sont incubées en plaque 96 puits sous 100 µL en milieu RPMI complet puis incubées 1 heure à 37 °C, 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité pour permettre leur adhérence. Après incubation, les cellules sont traitées avec différentes concentrations de la fraction insaponifiable (5 à 40 µg/mL) dans un volume final de 200 µL. Après 20 heures d'incubation à 37 °C, 20 µL de MTS/PMS sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est incubée 4 heures à 37 °C puis l'absorbance à 490 nm est mesurée. L'absorbance est proportionnelle à la respiration mitochondriale et donc à la viabilité cellulaire. La viabilité cellulaire est calculée grâce à l'équation :

$$\% \text{ viabilité} = \text{absorbance de l'échantillon} / \text{absorbance du control} \times 100$$

V.2.3 Traitements et activation des cellules

Les cellules (5×10^5 cellules/puits) sont distribuées en plaque 24 puits et incubées pendant 1 heure à 37 °C. Les cellules sont ensuite traitées par la fraction insaponifiable (5 à 40 $\mu\text{g/mL}$ diluée dans le RPMI complet) et stimulées par l'association LPS 1 ng/mL (*E. coli* : sérotype O111/B4, Sigma)/IFN γ 10 U/mL (Sigma) puis incubées à 37 °C. Dans un premier temps, deux traitements ont été évalués : le premier étant un traitement par la fraction insaponifiable simultanément à l'activation par le LPS/IFN γ , le deuxième étant un prétraitement de 4 heures par la fraction insaponifiable avant l'activation par le LPS/IFN γ . Par la suite, le choix du prétraitement de 4h a été choisi pour le reste des expérimentations. Les surnageants sont collectés à 6, 24 et 48 heures après l'activation pour le dosage de médiateurs ou conservés à -20 °C jusqu'à utilisation. Pour les analyses en Western-blotting, les cellules (3×10^6 cellules/puits) sont distribuées en plaque 6 puits.

V.2.4 Dosage des nitrites

Les nitrites sont dosés dans les surnageants de culture cellulaire 24 et 48 heures après l'activation des cellules, par le réactif de Griess, cf chapitre IV.2 (Boudard *et al.*, 1994).

V.2.5 Dosage des PGE₂, du TNF α , de l'IL-6 et de l'IL-10

Les PGE₂ sont dosées dans les surnageants de culture cellulaire 24 heures après l'activation par le LPS/IFN γ grâce à un kit EIA (*Enzyme-Immuno Assay*) (*Prostaglandin E₂ EIA Kit – Monoclonal*, Cayman chemical, SpiBio, France). Les surnageants sont dilués au 1/20^{ème} dans le tampon EIA pour obtenir des concentrations en PGE₂ comprises dans la gamme de linéarité de la droite d'étalonnage du dosage. Les cytokines (TNF α , IL-6, IL-10) sont dosées dans les surnageants de culture cellulaire 6 ou 24 heures après l'activation des cellules. Le dosage est une technique immuno-enzymatique de type ELISA (*Enzyme-labeled Immunosorbent Assay*) sandwich, qui utilise un duo d'anticorps (*Kit Elisa Ready-Set-Go* pour le TNF α , l'IL-6 et l'IL-10, eBiosciences, Clinisciences). Les dosages sont réalisés selon les instructions du fabricant.

V.2.6 Analyse en Western-blot de l'expression de l'iNOS et de la COX-2

Après 24 heures d'incubation, les cellules activées ou non sont placées sur la glace, et resuspendues dans 450 μL de tampon de lyse à 4 °C (tampon phosphate à 1 % de triton X100, en

présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche)). Après incubation 30 minutes sur la glace, les cellules sont scrappées et les lysats sont centrifugés à 13 000 g pendant 5 minutes pour récupérer le surnageant. 150 μ L de mix (125 mM Tris, 10 % glycérol, 2 % SDS, 5 % β -mercaptoéthanol, 0,5 % bleu de bromophénol) sont rajoutés aux surnageants, les lysats sont ensuite bouillis pendant 10 minutes et conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

Les protéines sont séparées sur un gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide à 8 % pendant 120 minutes à 0,03 A (tampon de migration : 190 mM glycine, 25 mM Tris, 0,1 % SDS, pH 8,3), et transférées sur une membrane de polyvinyl difluoride (PVDF, Immobilon-P, Millipore) une nuit à 4 °C à 0,07 A (tampon de transfert : 380 mM glycine, 50 mM Tris, 0,1 % SDS, 20 % méthanol). La membrane est ensuite bloquée dans un tampon Tris 0,05 % Tween-20 pH 7,4 (TBST) contenant 10 % de lait en poudre pendant 1 heure à température ambiante. Après 3 lavages successifs au TBST, la membrane est ensuite incubée 1 heure à température ambiante avec un anticorps primaire polyclonal anti-iNOS dilué au 1/1 000 (M-19, Santa Cruz Biotechnology, Santa-Cruz, CA, USA) ou anti-COX-2 dilué au 1/2 000 (M-19, Santa Cruz Biotechnology). Après 3 lavages successifs au TBST, la membrane est ensuite incubée 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-IgG couplé à la peroxydase dilué au 1/10 000 (Jackson ImmunoResearch). La membrane est également incubée avec un anticorps monoclonal anti-actine directement couplé à la peroxydase dilué au 1/2 000 (C-4, Santa Cruz Biotechnology). La révélation est ensuite réalisée par détection en luminescence (ECL ; Amersham Pharmacia Biotech). L'intensité des bandes est ensuite évaluée par densitométrie grâce au logiciel Image J (software, NIH, USA) et normalisée par rapport à la β -actine.

VI Étude des propriétés anti-inflammatoires *in vivo*

VI.1 Modèle d'inflammation aiguë chez le rat : œdème à la carragénine

Quarante huit rats Wistar (90 g \pm 10 g) (Elevage Janvier[®]) sont maintenus dans des conditions constantes (température 22 °C \pm 1 °C, cycle 12 heures de lumière/12 heures d'obscurité) et randomisés en 6 groupes de 8 animaux :

- un groupe contrôle
- un groupe traité par l'indométacine : 10 mg/Kg par VO

- un groupe traité par l'huile de pulpe : 5 mL/Kg par VO
- un groupe traité par l'huile de pulpe : 5 mL/Kg par voie IP
- un groupe traité par l'extrait insaponifiable brut : 100 mg/Kg par VO (15 % Tween 80)
- un groupe traité par l'extrait insaponifiable brut : 100 mg/Kg par voie IP (15 % Tween 80)

Après l'administration du traitement, un œdème aigu est induit dans la patte arrière droite du rat par injection sub-plantaire de 0,05 mL de carragénine à 2 % (p/v) en suspension dans du sérum physiologique (NaCl 9 ‰ p/v, sérum ϕ) (Winter *et al.*, 1962). Le volume de la patte est mesuré par un pléthysmomètre immédiatement après injection puis 1, 2, 3, 4, 24 et 48 heures après l'injection de carragénine. Le pourcentage d'inhibition est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [(V_t - V_0)_{\text{rat contrôle}} - (V_t - V_0)_{\text{rat traité}}] / (V_t - V_0)_{\text{rat contrôle}}$$

- V_t = volume de la patte arrière droite au temps t.
- V_0 = volume de la patte arrière droite immédiatement après l'injection de carragénine.

VI.2 Modèle d'inflammation aiguë chez la souris : choc endotoxique au LPS

Les souris utilisées sont des souris Balb/c mâle âgées de 6 semaines (Elevage Janvier[®]). L'administration de LPS (*E. Coli*, 055 :B5) par injection IP à la dose de 20 mg/Kg (dose sub-létale) permet d'induire un choc septique.

Les animaux ont été randomisés en 7 groupes de 8 souris :

- un lot témoin ;
- deux lots traités par le LPS pour effectuer un prélèvement à 1h30 et à 6h ;
- deux lots traités par le LPS et par l'huile d'awara par VO (5 mL/Kg) pour effectuer un prélèvement à 1h30 et à 6h ;
- deux lots traités par le LPS et par la fraction insaponifiable par voie IP (25 mg/Kg dans 10 % d'éthanol) pour effectuer un prélèvement à 1h30 et à 6h.

VI.2.1 Traitements

Le LPS est administré par voie intra-péritonéale à la dose de 20 mg/Kg sous un volume de 100 μ L, solubilisé dans du sérum ϕ . L'huile est administrée par VO sous un volume de 200 μ L. La fraction insaponifiable est administrée par voie IP sous un volume de 200 μ L. Elle est préparée

comme pour les tests *in vitro*, la solution utilisée correspond à une concentration en extrait de 2,5 mg/mL dans 10 % d'éthanol ce qui correspond à une dose administrée de 25 mg/Kg. Une injection de sérum ϕ à 10 % d'éthanol a donc été réalisée pour tous les autres lots. Les traitements sont donc les suivants :

Tableau 6 : Choc au LPS : Traitements des différents lots

	-24h	-2h		0h
Lots	VO de 200 μ L	IP/VO de 200 μ L	IP de 200 μ L	IP de 100 μ L
Témoin			sérum ϕ (10 % EtOH)	sérum ϕ
LPS 1h30			sérum ϕ (10 % EtOH)	LPS
LPS 6h			sérum ϕ (10 % EtOH)	LPS
Huile VO 1H30	Huile VO	Huile VO	sérum ϕ (10 % EtOH)	LPS
Huile VO 6h	Huile VO	Huile VO	sérum ϕ (10 % EtOH)	LPS
Fr. Insap. IP 1h30		Fr. Insap. IP		LPS
Fr. Insap. IP 6h		Fr. Insap. IP		LPS

VI.2.2 Prélèvements

Les prélèvements ont ensuite été réalisés 1h30 ou 6h après l'injection de LPS.

Après anesthésie des souris au pentobarbital par voie IP, le sang est prélevé par ponction cardiaque puis laissé coaguler à température ambiante pendant 30 minutes. Le sérum est récupéré et aliquoté à -20 °C après centrifugation du sang à 3 000 g pendant 20 minutes à 4 °C.

Le foie, les poumons, les reins et la rate sont prélevés rapidement après le prélèvement du sang et rincés dans du PBS (*Phosphate Buffered Saline*), pesés et congelés directement dans l'azote liquide, puis conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

Les différents organes sont broyés à l'aide d'un ultraturax dans un tampon de lyse froid constitué de 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % Triton X100, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF. Ils sont ensuite centrifugés à 4 °C pendant 10 minutes à 15 000 g et les surnageants sont aliquotés et conservés à -20 °C.

VI.2.3 Dosage des protéines

Les protéines sont dosées dans les surnageants des broyats par la méthode de Bradford adaptée en microplaque. Brièvement, 10 μ L d'échantillons sont mélangés à 200 μ L de réactif de Bradford (0,5 mg/mL de Bleu de Coomassie G, 25 % de méthanol, 42,5 % de H₃PO₄), et

l'absorbance est lue à 595 nm. Le taux de protéines est déterminé grâce à une gamme étalon dans le PBS réalisée avec de l'albumine sérique bovine (BSA) (1,4 à 0,25 mg/mL). Les différents échantillons sont dilués dans du tampon PBS de façon à être compris dans la gamme réalisée.

VI.2.4 Dosage des cytokines

Les cytokines (TNF α , IL-6, IL-10) sont dosées dans le sérum et dans les surnageants des broyats par ELISA, qui utilise un duo d'anticorps cf paragraphe V.2.5.

VI.2.5 Mesure de la capacité antioxydante du sérum

La capacité antioxydante du sérum des animaux est mesurée par une méthode adaptée de la technique ORAC (Ou *et al.*, 2001). Les sérums sont dilués au 1/500 dans un tampon phosphate 75 mM, pH 7,4 ; 20 μ L de chaque échantillon est ensuite incubé pendant 15 minutes à 37 °C avec 160 μ L de fluorescéine à $7,875 \times 10^{-8}$ M (Sigma). Puis 20 μ L d'une solution d'AAPH à 178 mM sont ajoutés. La mesure de la fluorescence est réalisée par un spectrofluorimètre (TECAN infinite 200) toutes les minutes pendant 1 heure jusqu'à ce que la fluorescence soit inférieure ou égale à 10 % de la valeur initiale. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 485 nm et la longueur d'onde d'émission à 520 nm. Pendant toute la mesure, la température est maintenue à 37 °C. Les valeurs ORAC sont calculées en utilisant une équation de régression entre la concentration de Trolox (10 à 50 μ M) et l'aire nette sous la courbe de décroissance de la fluorescence. L'aire sous la courbe (AUC) et l'aire nette (AUC_{net}) sont déterminées en utilisant les deux équations ci-dessous :

- $$AUC = 0,5 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots + f_{59}/f_0 + 0,5 f_{60}/f_0$$

 f_0 : fluorescence initiale lue à 0 minute et f_i : fluorescence lue au temps i

- $$AUC_{net} = AUC_{\text{échantillon}} - AUC_{\text{blanc}}$$

Les valeurs ORAC sont exprimées en μ M d'équivalents Trolox.

VI.3 Modèle d'inflammation bronchique chez le rat sensibilisé

VI.3.1 Modèle animal

Les rats utilisés sont des rats mâles Brown Norway (Elevage Janvier[®]) âgées de 10 semaines au début de l'expérimentation. Les rats Brown Norway constituent une souche de rats largement utilisée dans la recherche sur l'asthme puisqu'elle présente les caractéristiques de

produire des taux élevés d'IgE, d'avoir une forte inflammation bronchique et de développer une hyperréactivité bronchique en réponse à une sensibilisation supérieure aux autres souches de rats (Hylkema *et al.*, 2002 ; Pauwels *et al.*, 1979).

VI.3.2 Sensibilisation et traitement

Les animaux ont été randomisés en 4 groupes de 8 rats :

- un groupe témoin non sensibilisé : C
- un groupe sensibilisé à l'ovalbumine : OVA
- un groupe sensibilisé à l'ovalbumine et traité par l'huile de pulpe par voie IP : AIP
- un groupe sensibilisé à l'ovalbumine et traité par l'huile de pulpe par voie orale : AO

La sensibilisation à l'ovalbumine est réalisée en deux étapes (Roumestan *et al.*, 2007). La première étape consiste en une sensibilisation par voie générale à J1, J2, J3, J16 par injection IP de 1 mL d'un mélange ovalbumine (1 mg/mL) (Sigma) et d'hydroxyde d'aluminium (100 mg/mL) (Sigma), mis en solution dans du sérum ϕ . Les rats contrôles reçoivent l'hydroxyde d'aluminium seul. L'administration d'hydroxyde d'aluminium avec un antigène joue le rôle d'adjuvant et permet une réaction de type Th2 (Brewer *et al.*, 1999). La deuxième étape consiste en une sensibilisation par voie locale de J22 à J29 par nébulisation d'ovalbumine à 10 mg/mL dans du sérum ϕ . Le groupe contrôle reçoit des nébulisations de sérum physiologique. Les traitements par l'huile de pulpe sont réalisés pendant 8 jours consécutifs (J22 à J29) soit par voie IP (0,5 mL/rat) soit par VO (0,5 mL/rat).

VI.3.3 Évaluation de l'inflammation

A J29, les animaux sont anesthésiés au pentobarbital par voie IP. L'aorte abdominale est rapidement cathétérisée afin de récupérer le sang dans un tube hépariné et d'éviter la contamination du liquide de lavage broncho-alvéolaire (BALF) par les cellules de la circulation sanguine. Le sang est centrifugé 3 minutes à 1 000 g, le plasma récupéré est aliquoté et conservé à -20 °C. Une trachéotomie est réalisée et 3 fois 4 mL de tampon PBS sont injectés dans les poumons. Le PBS est récupéré après massage de la cage thoracique.

VI.3.3.a Évaluation de l'inflammation par le dénombrement cellulaire dans le BALF

Les cellules totales présentes dans le BALF sont dénombrées sur cellule de Malassez juste après le prélèvement. Les cellules du BALF sont ensuite déposées sur une lame grâce à l'utilisation d'un cytopspin (400 tours/min pendant 5 minutes) qui permet de concentrer les cellules. Les cellules sont ensuite fixées sur la lame par le méthanol. La coloration des lames est réalisée par Hemacolor® coloration rapide (VWR international) ce qui a permis de dénombrer les différents types cellulaires (macrophages, éosinophiles, neutrophiles et lymphocytes) présents dans le BALF. Un minimum de 300 cellules est dénombré dans chaque BALF. Le BALF restant est centrifugé et le surnageant récupéré est conservé à -20 °C pour les dosages biochimiques.

VI.3.3.b Mesure de la capacité antioxydante du BALF et du plasma

La capacité antioxydante du BALF et du plasma des animaux est mesurée par la technique ORAC (voir § VI.2.5). Les plasmas sont dilués au 1/400 dans un tampon phosphate 75 mM, pH 7,4, les BALF sont directement utilisés.

VI.3.3.c Mesure du taux de protéines totales du BALF

Le dosage des protéines totales dans le BALF a été réalisé par la méthode Bradford (voir § VI.2.3).

VI.3.3.d Mesure de l'activité éosinophile peroxydase du BALF

L'activité éosinophile peroxydase (EPO) du BALF reflète l'activation des polynucléaires éosinophiles. Cette activité est mesurable par un test colorimétrique d'oxydation de l'OPD (o-phénylènediamine) par l'EPO en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Strath *et al.*, 1985). Brièvement, 100 µL de BALF sont mélangés en plaque 96 puits à 100 µL de la solution substrat (0,1 mM OPD, 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0), Triton X100, 1 mM H₂O₂) et incubés 10 minutes à l'obscurité. La réaction est stoppée par ajout de 50 µL d'H₂SO₄ 1 N, et l'absorbance est lue à 490 nm.

VII Statistiques

Les résultats présentés sont exprimés en moyenne \pm sem (*Standard error of the mean*). Les analyses statistiques sont réalisées en utilisant le test t de Student sur valeurs non appariées. Les moyennes sont considérées comme significativement différentes pour une valeur de $p < 0,05$.

Résultats et Discussion

I Composition chimique, propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes de l'huile de pulpe d'awara

I.1 Caractéristiques physico-chimiques du fruit et de l'huile de pulpe d'awara

Les fruits d'awara utilisés ont un poids d'environ 27 g, et la pulpe, très fibreuse et huileuse, représente plus de 52 % du poids total du fruit. L'extraction par soxhlet permet d'obtenir un rendement en huile de pulpe de 13,9 % (Tableau 7), les données de la littérature donnant une fourchette allant de 9,5 à 22 % (Lubrano *et al.*, 1994 ; Oboh et Oderinde, 1988).

La limite maximale d'indice d'acide pour les huiles vierges a été fixée par l'OMS à 4 mg de KOH/g d'huile, l'indice d'acide de l'huile de pulpe d'awara est nettement inférieur à cette limite ($0,94 \pm 0,03$ mg KOH/g). La limite maximale d'indice de peroxyde pour les huiles vierges a, quant à elle, été fixée à 15 meq d'oxygène actif/kg d'huile, l'indice de peroxyde mesuré pour l'huile de pulpe d'awara est également inférieur à cette limite ($10,3 \pm 0,11$ meq O₂/Kg). Selon ces deux indices, l'huile de pulpe d'awara produite est donc de bonne qualité.

La teneur en insaponifiable de l'huile de pulpe d'awara produite est de 0,75 % (Tableau 7), ce qui est en accord avec les teneurs en insaponifiable déjà publiées (Lubrano *et al.*, 1994).

La plupart des méthodes d'études du pouvoir antioxydant sont des méthodes réalisées en tampon aqueux. Nous avons donc choisi la méthode DPPH qui permet l'utilisation de solvant apolaire pour solubiliser l'huile. La coloration intense de l'huile de pulpe d'awara par les caroténoïdes entraîne un biais dans l'expérimentation. Classiquement l'absorbance est lue à 515 nm, cependant des travaux ont montré que pour diminuer l'interférence du lycopène ou du β -carotène, l'absorbance pouvait être lue à 540 nm (Liu *et al.*, 2008). L'utilisation de cette longueur d'onde ainsi que la soustraction de la coloration permet de se rapprocher de la capacité antioxydante réelle de l'huile de pulpe d'awara, les résultats restant cependant discutables. La capacité de piégeage à 50 % du radical DPPH (SC₅₀) a été déterminée en milieu éthanol/hexane. L'huile de pulpe d'awara a montré un SC₅₀ de $67,06 \pm 3,1$ mg/mL et l' α -tocophérol, molécule de référence, a montré un SC₅₀ de $20,4 \pm 0,4$ μ g/mL, valeur comparable aux données de la littérature (Gülçin *et al.*, 2010).

Pour permettre une comparaison à la littérature, nous pouvons exprimer cette capacité d'inhibition de 50 % du radical DPPH en g d'huile/g de DPPH. Nous obtenons alors une valeur de 342 g d'huile/g de DPPH. Comparée à l'huile d'açaï (646 g d'huile/g de DPPH) (Rufino *et al.*, 2010) ou à l'huile d'olive extra-vierge (2057 g d'huile/g de DPPH) (Arranz *et al.*, 2007), l'huile de pulpe d'awara a une capacité antioxydante 2 fois plus importante que l'açaï et 6 fois plus importante que l'huile d'olive.

Tableau 7 : Caractéristiques physico-chimiques du fruit et de l'huile de pulpe d'awara.

Fruit		
Poids (g)	27 ± 0,3	n=3, x=100
Pourcentage de pulpe par fruit (%)	52,3 ± 0,9	n=3, x=100
Rendement en huile de pulpe (%)	13,9 ± 0,3	n=10
Huile		
Rendement en extrait insaponifiable de l'huile (%)	0,75 ± 0,02	n=20
Indice d'acide de l'huile (mg KOH/g)	0,94 ± 0,03	n=3
Indice de peroxyde de l'huile (meq O ₂ /Kg)	10,3 ± 0,11	n=3
SC ₅₀ DPPH (mg/mL)	67,06 ± 3,1	n=3

Les résultats sont la moyenne ± sem de n déterminations indépendantes ; x est le nombre de fruits utilisés pour chaque expérience.

I.2 Effets de l'huile de pulpe d'awara et de l'extrait insaponifiable dans l'œdème à la patte induit par la carragénine

I.2.1 Effet de l'huile de pulpe d'awara

Nous avons étudié les propriétés anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara dans un modèle d'inflammation aiguë par mesure de l'œdème à la patte induit par la carragénine. L'indométacine, utilisée comme anti-inflammatoire de référence, a montré une inhibition de l'œdème de l'ordre de 50 % au cours des premières heures après l'induction de l'œdème, alors que l'huile de pulpe d'awara par voie orale n'a pas montré d'effet significatif sur l'œdème (Figure 26). L'absence d'effet inhibiteur de ce traitement peut être expliqué par une absorption ou une biodisponibilité faible et/ou lente des molécules actives de l'huile. Le traitement par voie IP a montré un très faible effet au cours des premières heures (inférieur à 10 %). Une inhibition

significative mais faible (24 %) apparaît 24h après l'induction de l'œdème. L'administration par voie IP semble permettre une meilleure biodisponibilité des microconstituants de l'huile de pulpe que le traitement par voie orale. Un protocole incluant plusieurs administrations en prévention de l'œdème pourrait être envisagé afin d'observer un éventuel effet anti-inflammatoire significatif.

Les travaux d'Asma Chaik (Chaik, 2003) ont quant à eux montré que l'huile de pulpe d'awara administrée par voie orale entraînait une inhibition significative de l'œdème avec un maximum d'activité 4h après l'injection ; les doses testées de 500 et 2 000 mg/Kg ont montré respectivement une inhibition de 20 et 25 %. Pour comparaison, la dose testée de 5 mL/Kg dans notre protocole expérimental correspond à environ 4 400 mg/Kg ce qui est le double de la dose ayant montrée une inhibition significative de 25 % dans les travaux cités précédemment.

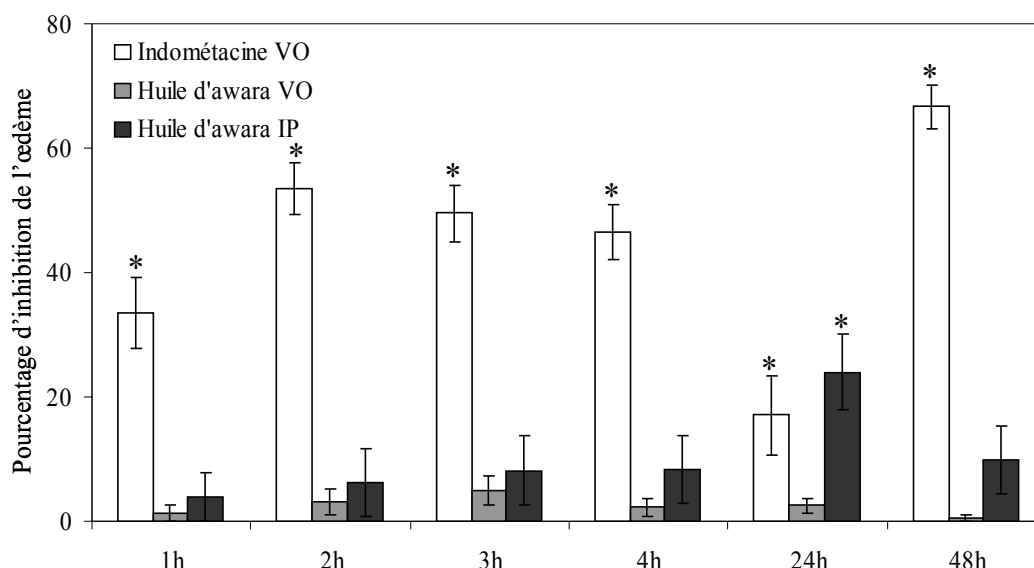


Figure 26 : Effet de l'huile de pulpe d'awara sur l'œdème à la patte induit par la carragénine. L'huile de pulpe d'awara est administrée par voie IP ou par VO à la dose de 5 mL/Kg simultanément à l'injection sub-plantaire de carragénine. L'inhibition de l'œdème est comparée à l'indométacine administrée à la dose de 10 mg/Kg par VO. Les résultats sont la moyenne \pm sem ($n=8$), * : $p < 0,05$ vs control.

I.2.2 Effet de l'extrait insaponifiable

Nous avons également étudié l'effet de l'extrait insaponifiable dans ce modèle d'œdème à la patte induit par la carragénine (Figure 27). L'extrait insaponifiable a été mis en suspension dans une solution contenant 15 % de Tween 80. Le traitement par voie orale n'a pas montré d'effet inhibiteur sur l'œdème, tandis que le traitement par voie IP a montré une inhibition de l'œdème de l'ordre de 30 % au cours des premières heures après l'induction de l'œdème. Ces résultats sont

significativement différents du lot contrôle seulement à 3h et 48h du fait d'une grande variabilité entre les animaux. La solubilisation de l'extrait insaponifiable dans 15 % de Tween 80 semble interférer dans l'absorption des molécules bioactives, et donc limiter les propriétés anti-inflammatoires potentielles de l'extrait insaponifiable.

Les travaux d'Asma Chaik (Chaik, 2003) ont aussi porté sur l'effet anti-inflammatoire de l'extrait insaponifiable solubilisé dans 2 % de Tween 80 à différentes doses. Ils ont mis en évidence une inhibition significative de l'œdème à la fois par voie orale et IP, la dose de 5 mg/Kg montrant un maximum d'inhibition à 4h de 60 % par voie orale et de 80 % par voie IP. Cette différence d'activité pourrait être liée au faible pourcentage de Tween 80 utilisé permettant une meilleure biodisponibilité des molécules actives.

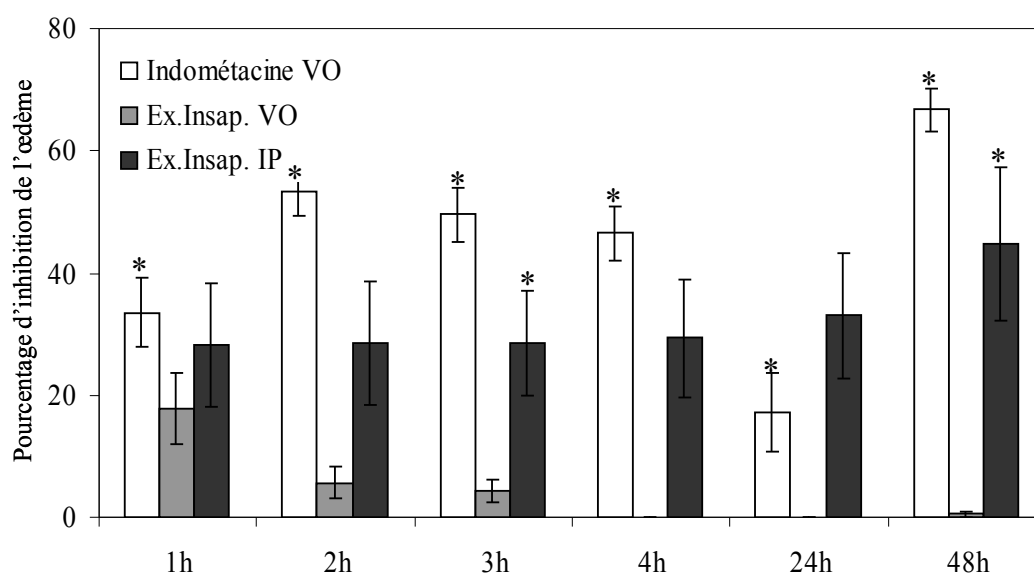


Figure 27 : Effet de l'extrait insaponifiable sur l'œdème à la patte induit par la carragénine. L'extrait insaponifiable est administré par voie IP ou par VO à la dose de 100 mg/Kg (15 % Tween 80) simultanément à l'injection sub-plantaire de carragénine. L'inhibition de l'œdème est comparée à l'indométacine administrée à la dose de 10 mg/Kg par VO. Les résultats sont la moyenne \pm sem ($n=8$), * : $p < 0,05$ vs control.

En conclusion, nous n'avons pas mis en évidence d'effet anti-inflammatoire significatif de l'huile de pulpe (orale ou IP) ou de l'extrait insaponifiable par voie orale dans notre modèle d'œdème à la carragénine. L'administration de l'extrait par voie IP entraîne un effet anti-inflammatoire mais qui reste limité (de 30 % à 1h à 45 % à 48h) en comparaison avec l'indométacine. Nous avons donc par la suite utilisé d'autres modèles expérimentaux afin de confirmer ou d'infirmer ces premiers résultats.

I.3 Publication n°1

L'analyse de la composition en différents constituants de l'huile de pulpe d'awara ainsi que l'évaluation de ses propriétés biologiques dans deux modèles d'inflammation *in vivo* vont faire l'objet d'une publication.

L'huile de pulpe d'awara a été caractérisée pour sa composition en acides gras et en microconstituants tels que les caroténoïdes, les tocophérols et les phytostérols. Nous avons ensuite évalué les propriétés anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara dans deux modèles d'inflammation. Le premier modèle d'étude a été un choc endotoxique induit par le LPS chez la souris dans lequel nous avons pu évaluer l'effet d'un pré-traitement par voie orale sur la production de différentes cytokines inflammatoires. Le deuxième modèle d'étude a été un modèle asthmatiforme induit par sensibilisation à l'ovalbumine chez le rat Brown-Norway dans lequel nous avons pu évaluer l'effet d'un traitement par voie orale et par voie intra-péritonéale sur l'inflammation bronchique.

PUBLICATION N°1

Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil : Chemical Characterization, and Anti-inflammatory Properties in a mice model of endotoxic shock and a rat model of pulmonary inflammation

Emilie Bony, Frédéric Boudard, Pierre Brat, Emilie Dussossoy, Karine Portet, Jean Giaimis, Alain Michel

**Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil: Chemical Characterization, and
Anti-inflammatory Properties in a mice model of endotoxic shock and a rat model of
pulmonary inflammation**

Emilie Bony, Frédéric Boudard, Pierre Brat, Emilie Dussossoy, Karine Portet, Jean Giaimis, Alain Michel

Abstract

Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) is a palm fruit mainly used in nutrition and recommended for therapeutic indications in the traditional pharmacopoeia of French Guiana. We analysed awara pulp oil for tocopherol, carotenoid, and phytosterol composition because of their antioxidant and/or anti-inflammatory properties (β -carotene and β -sitosterol major compounds). Then, we evaluated whether awara pulp oil may attenuate acute and chronic inflammation *in vivo*. In a murine endotoxic shock model, awara pulp oil treatment decreased LPS-induced pro-inflammatory interleukin (IL)-6 and Tumor Necrosis Factor α (TNF α), and increased anti-inflammatory IL-10 in serum, suggesting that awara pulp oil administration can efficiently counteract an acute inflammatory response *in vivo*. Using an ovalbumin-sensitized rat model of pulmonary inflammation, we found that awara pulp oil treatment was effective to reduce eosinophil and lymphocyte numbers recovered into the broncho-alveolar lavages. These results confirm anti-inflammatory properties of awara pulp oil probably mediated in part by carotenoid, phytosterol, and tocopherol.

Keywords

Anti-inflammatory activities, awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil, carotenoids, endotoxic shock, phytosterols, pulmonary inflammation, tocopherols.

1 Introduction

Astrocaryum vulgare M., commonly called awara in French Guiana, belongs to the Arecaceae family and grows in the Northeast region of Brazil, in French Guiana and neighbouring areas. This palm tree has orange drupes, ovoid in shape that are used in nutrition and as indicated by the traditional pharmacopoeia of French Guiana, for therapeutic purpose in eye and skin diseases (Kahn, 2008). Even if the fruit pulp is mainly consumed as oil very rich in carotenoids (Cavalcante, 1977), only few data on its biological activities are available (Baurin, Arnoult, Scior, Do, & Bernard, 2002; Bernard, Scior, Didier, Hibert, & Berthon, 2001).

Fruit and vegetables are a high source of antioxidant and/or anti-inflammatory compounds such as carotenoids, phytosterols, and tocopherols. Accumulating data have revealed that a diet enriched in such components may prevent the development of several diseases associated with chronic inflammatory states (Allen, J. R. Britton, & Leonardi-Bee, 2009; Calder *et al.*, 2009). Thus, high antioxidant dietary intake might ensure a defense against oxidative damage and therefore alleviate inflammation. The highest dietary sources of phytosterols and tocopherols are seeds and oils. Phytosterols have already showed anti-inflammatory activities *in vivo* (Navarro, De Las Heras, & Villar, 2001). Particularly, β -sitosterol, the most abundant phytosterol, has already shown anti-inflammatory activities *in vitro* (Loizou, Lekakis, Chrousos, & Moutsatsou, 2010) and *in vivo* in ovalbumin-induced lung inflammation (Yuk *et al.*, 2007). Tocopherols are considered as the most effective lipid soluble antioxidant, which prevent lipid peroxidation by acting as peroxyl radical scavengers. Beside antioxidant properties, tocopherols also possess anti-inflammatory properties (Singh & Devaraj, 2007) and have been shown to reduce airway inflammation and airway hyperresponsiveness in animal model (Okamoto, Murata, Tamai, Tanaka, & Nagai, 2006). Carotenoids are a widely distributed class of natural pigments which possess antioxidant properties (Krinsky & E. Johnson, 2005), and β -carotene, the most abundant in foods, already showed anti-inflammatory properties *in vitro*, in endotoxic shock (Bai *et al.*, 2005), and beneficial effects in allergic model (Sato *et al.*, 2004). Thus, consumption of vegetable oils with high content of minor compounds such as phytosterols, tocopherols, and carotenoids, may have potential beneficial effects on inflammatory diseases. Indeed, olive or palm oil have already shown beneficial effects in inflammatory diseases that are partially due to minor compounds (Bester, Esterhuyse, Truter, & Van Rooyen, 2010).

Inflammation is a complex process mediated by activation of inflammatory and immune cells. Acute or chronic inflammation plays a critical role in the initiation or development of many human diseases such as septic shock, rheumatoid arthritis, asthma, or cancer (Federico, Morgillo, Tuccillo, Ciardiello, & Loguercio, 2007; Halayko, 2003). The overproduction of reactive oxygen species (ROS) leading to imbalance between oxidative stress and antioxidant defenses also contributes to the host inflammatory response (Calder *et al.*, 2009).

In this study, we have analyzed awara pulp oil for fatty acid, tocopherol, carotenoid, and phytosterol contents. Then, we have evaluated whether awara pulp oil administration was effective to reduce acute inflammation in a murine endotoxic shock model, and chronic inflammation in a rat model of pulmonary inflammation.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

All solvents were HPLC or analytical grade, purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France) except methyl tert-butyl ether (MTBE) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). KOH, bovine serum albumine (BSA), $\text{Al}(\text{OH})_3$, sodium methoxide, acetyl chloride, lipopolysaccharide (LPS) (*E. Coli*, 055 :B5), Tris HCl, NaCl, Triton X100, DTT, EDTA, EGTA, PMSF, ovalbumin, aluminium hydroxyde, fluorescein, 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethyl-2-carboxylic acid (Trolox), fatty acid methyl ether (FAME) standards, α -tocopherol, stigmasterol, campesterol, sitosterol, fucosterol, and 5α -cholestane- 3β -ol were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). 2-2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was purchased from Wako Chemicals (Richmond, USA). Anhydrous sodium sulphate, phenolphthalein, and potassium hydroxide were purchased from Carlo Erba. Tocopherol standards were from VWR International SAS (Fontenay sous Bois, France). Cycloartenol and β -carotene were from Extrasynthese (Genay, France).

2.2 Plant materials and sample preparation

Awara fruits (*Astrocaryum vulgare* M.) were obtained from CIRAD French Guiana (Combi station, Sinnamary, March 2008) and were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Pulp fruit was manually removed from the seeds, and ball milled with liquid nitrogen for Soxhlet extraction of oil with hexane (4 h). After drying with anhydrous sodium sulfate, the solvent was removed by vacuum distillation at 30°C to obtain the crude oil, stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ under nitrogen. For carotenoid and

phytosterol analysis, the unsaponifiable extract was obtained by saponification of 10 g of awara pulp oil by refluxing with 50 ml of methanolic solution of KOH 2 M for 1 h. After cooling at room temperature, 100 ml of water was added. The aqueous phase was washed three times with hexane, and the hexanic fractions were collected, washed with water, dried with anhydrous sodium sulphate, and then evaporated to dryness. The unsaponifiable extract obtained was stored at -20 °C under nitrogen.

2.3 Fatty acid composition

Awara pulp oil (3 to 4 drops) was diluted in 3 ml sodium methoxide solution containing phenolphthalein and refluxed for 10 min. 3 ml of methanol hydrochloride solution (prepared with 50 ml acetyl chloride and 625 ml methanol) was added until phenolphthalein discoloration. The mixture was refluxed again for 10 min and cooled to room temperature. After addition of 10 ml ultrapure water, the organic phase containing FAME was extracted with 8 ml hexane and dried over anhydrous sodium sulphate for subsequent GC analysis using Agilent 6890 series GC apparatus with a Supelcowax 10 capillary column (SGE, Courtaboeuf, France) with the following characteristics: length, 30 m; id, 0.25 mm; film thickness, 0.25 μ m. Carrier gas was helium at a flow rate of 1 ml/min, and a 1/100 split ratio. The temperatures were 250 °C and 270 °C for the injector and flame ionization detection respectively. Oven temperature settings were as follows: 130 °C for 2 min, 130 to 225 °C at 4 °C/min, and hold at 225 °C for 7 min. FAME were identified by comparison with commercially available FAME standards. Analyses were done in triplicate independent measurements and results were expressed as relative percentage of total fatty acids \pm sem.

2.4 Tocopherol identification and quantification

Quantification of tocopherols present in awara pulp oil was performed by normal phase HPLC with fluorometric detection (excitation: 290, emission: 330 nm) with an ACE 5 SIL column (250 \times 4.6 mm; porosity, 5 μ m, Advanced Chromatography Technologies®, Aberdeen, Scotland, UK). The HPLC consists of modules provided by Thermo Finnigan (France): a quaternary pump (P1000XR), a sample passor (AS1000) and a valve of injection to 6 ways provided with a loop of 20 μ l, a spectrofluorimetric detector (FL3000) and software for data processing (PC 100). The elution was performed with a mobile phase: hexane/dioxane 97/3 at 1 ml/min. The determination was carried out with a standard curve of authentic tocopherols.

Analyses were done in triplicate independent measurements and results were expressed as μg of tocopherols per g of oil \pm sem.

2.5 Phytosterol identification and quantification

GC-MS analysis of the unsaponifiable extract was performed on an Agilent 6890 GC fitted with a DB1 column (length, 30 m; id, 0.25 mm; film thickness, 0.25 mm; J&W Scientific, Folsom, CA, USA), equipped with an Agilent 5973N mass selective detector that allowed the direct analysis of sterols without derivatisation. The injector was set at 290 °C and injection volume was 1 μl . The carrier gas was helium at a flow rate of 1 ml/min and the temperature settings were as follows: 5 min at 250 °C, from 250 °C to 270 °C at 1 °C/min, from 270 °C to 290 °C at 10 °C/min. The mass spectrometer was operated in the electron impact ionization mode (70 eV), the source temperature was programmed at 250 °C, and the range mass of acquisition was 50-450 Da. The identification of the components was based on the comparison of their mass spectra with those of NIST (National Institute of Standards and Technology) library and literature data, as well as by comparison of their retention times with co-injection of standards. For quantification, 50 μg of 5 α -cholestane-3 β -ol was added to 1g of oil before saponification. Analyses were done in triplicate independent measurements and results were expressed as μg of 5 α -cholestane-3 β -ol equivalent per g of oil \pm sem.

2.6 Carotenoid identification and quantification

HPLC-DAD-MS analysis of the unsaponifiable extract was performed on a Surveyor plus model equipped of an autosampler, a PDA detector and LC pumps (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA). Carotenoids were separated along a C30 column (250 \times 4.6 mm, 5 μm particle size), YMC (EUROP, GmbH, Dinslaken, Germany). The mobile phases were water as eluent A, methanol as eluent B and MTBE as eluent C. Flow rate was fixed at 1 ml/min and the column temperature was set at 25 °C. A gradient program was performed: 0 min, (40/60/0) (% A/% B/% C); 0-5 min, (20/80/0); 5-10 min, (4/81/15); 10-60 min, (4/11/85); 60-71 min, (0/100/0); 71-72 min, back to the initial conditions for reequilibration. The injection volume was 20 μl and the detection was carried out between 250 and 600 nm. After passing through the flow cell of the diode array detector the column eluate was split and 0.5 ml was directed to the ion trap mass. Experiments were performed in APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) positive ion mode, with total ion current scanning range 100-1500 m/z , corona current 5 μA , source temperature, 450 °C, capillary temperature, 350 °C, capillary voltage, 10 V and N_2 as dry gas at

80 ml/min. Carotenoid identification was done based on retention times, absorption spectra, % III/II, mass spectra, and comparison with literature data (G. Britton, Liaaen-Jensen, & Pfander, 2004; De Rosso & Mercadante, 2007).

Carotenoids were quantified by HPLC using an Agilent 1100 System (Massy, France). The column and gradient conditions were the same as used in mass spectrometry analysis. The injection volume was 20 μ l. Absorbance was followed at 290, 350, 400 and 450 nm using an Agilent 1100 photodiode array detector. Chromatographic data and UV visible spectra were collected, stored and integrated using an Agilent Chemstation plus software. A standard curve was obtained with β -carotene standard to determine the total amount of carotenoids. The concentration of β -carotene solutions was calculated by spectrophotometric measurement at 450 nm by dissolving standard with the appropriate solvent and using a molar extinction coefficient (ϵ) (G. Britton *et al.*, 2004). Quantification of phytoene, phytofluene, and ζ -carotene isomers was done at their maximum absorption wavelength (290, 350, and 400 nm respectively) and expressed as β -carotene equivalent at 450 nm. Analyses were done in triplicate independent measurements and results were expressed as μ g of β -carotene equivalent per g of oil \pm sem.

2.7 Animals

Animals were obtained from Janvier[®] (France) and kept at an ambient temperature of 22 ± 2 °C under a 12 h normal phase light-dark cycle. Food and water were provided ad libitum, and animals were acclimated for 1 week prior to the start of the experiment.

2.8 Endotoxic shock model

Six-week-old male Balb/c mice were randomly assigned to five groups of 8 mice. Control group was intraperitoneally (IP) injected with saline. LPS groups were evaluated 1.5 h (LPS 1.5 h) or 6 h (LPS 6 h) after IP injection of LPS (20 mg/Kg). AO (Awara Oral) groups were twice orally pre-treated with awara pulp oil (5 ml/Kg 24 h and 2 h before LPS injection) and evaluated 1.5 h (AO 1.5 h) or 6 h (AO 6 h) after LPS injection. Blood samples were collected by cardiac puncture 1.5 h or 6 h after LPS injection and kept 30 min at room temperature for clotting and centrifuged at 3 000 g during 20 min at 4 °C. Sera were stored at -20 °C until cytokine quantification. The following tissues were quickly removed and snap frozen: liver, spleen, kidney, and lung. Tissues were homogenized in cold lysis buffer (10 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF) and centrifuged at 4 °C

during 10 min at 15 000 g. Supernatants were stored at -20 °C until cytokine quantification. Cytokines (tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin (IL)-6, IL-10) were measured using ELISA kits (eBioscience, Clinisciences, Montrouge, France) following the manufacturer's instructions. Detection limits were 4, 4, and 2 pg/ml for TNF α , IL-6, and IL-10, respectively. Proteins were assayed in supernatants of homogenized tissue according to Bradford method and quantification was achieved with a standard curve of BSA.

2.9 Pulmonary inflammation model

Ten-week-old male Brown Norway rats were randomly assigned to four groups of 8 rats: control group, ovalbumin-sensitized (OVA) group, and two sensitized/treated groups. Rats were sensitized to ovalbumin by IP injection (1 ml/rat) at day 1, 2, 3, and 16 with ovalbumin (1 mg/ml emulsified with Al(OH)₃ 100 mg/ml in saline). From day 22 to 29, a nebulization of 1% (w/v) ovalbumin solution during 20 min was performed; 30 min after nebulization, awara pulp oil was administrated (0.5 ml/rat) by oral (AO) or IP administration (AIP). Blood samples were collected at day 29 from the abdominal aorta in heparin tube and centrifuged (1 000 rpm for 5 min). Plasma samples were stored at -20 °C for analyses. The trachea was cannulated and rinsed *in situ* with PBS (4 × 3 ml). The total number of cells in BALF (Bronchoalveolar Lavage Fluid) was immediately determined by counting on Malassez chamber, then cells were spun down on cytospin slides (Cytospin II, SHANDON, England) 5 min at 400 tr/min, fixated, and stained by Hemacolor Kit (Merck). BALF was then centrifuged and supernatants were stored at -20 °C for biochemical determinations. Differential cell counts were determined from cytospin preparations by counting 300 cells identified as macrophages, eosinophils, lymphocytes, and neutrophils according to standard morphology under × 400 magnification. Because the yield of the recovered BALF was equivalent in all experimental groups (~80%), the results are expressed as absolute cell counts per milliliter of lavage fluid. Evaluation of BALF eosinophil peroxidase was performed with a colorimetric assay based on the oxidation of OPD (0-Phenylenediamine) by EPO (Eosinophil Peroxydase Protein). BALFs (100 μ l) were mixed with a substrate solution SIGMAFAST™ OPD (Sigma-Aldrich). After 20 min incubation at room temperature, the reaction was stopped by adding H₂SO₄ 1 N and optical density was measured at 492 nm. Total proteins in BALF were determined by Bradford method.

2.10 ORAC determination

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) assays were performed on a microplate spectrofluorimeter TECAN Infinite 200 (TECAN Austria GmbH) in 96 well polypropylene plates. The excitation and emission wavelengths were 485 ± 9 nm and 520 ± 20 nm respectively. Solutions were all prepared with 75 mM Phosphate buffer (pH 7.4). Fluorescein and trolox solution were daily made using a 787.5 μ M and a 500 μ M stock solution respectively and stored in the dark at 4 °C. AAPH was made daily and discarded within 8 h if unused. Each well was filled with 160 μ l of a 78.75 nM fluorescein (FL) solution (63 nM final in the well) and 20 μ l of the buffer, the standard 0-40 μ M Trolox solution (0-4 μ M final), or the sample (plasma, serum, or BALF). The plate was incubated at 37 °C during 15 min before 20 μ l of a 178 mM AAPH solution (17.8 mM final) were added. After the AAPH addition, the fluorescence decay was measured every minute during 60 min. The final values were calculating by using a regression equation between the trolox concentration and the net area under the FL decay curve. The ORAC values were expressed as micromole Trolox equivalents per ml of plasma, serum, or BALF.

2.11 Statistical Analysis

Data were expressed as mean \pm sem. Statistical significance was determined by unpaired Student's t-test, $p < 0.05$ was considered significant.

2.12 Animal Care and Use

These experiments were carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the US National Institutes of Health. Our laboratory practice was approved by the « Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale Languedoc-Roussillon »

3 Results and Discussion

3.1 Chemical composition of awara pulp oil

Awara pulp oil has a high carotenoid content (Cavalcante, 1977), entailing potential biological properties. So, we first analyzed awara pulp oil for chemical composition to characterize and understand potential biological effects. We focused on tocopherols, carotenoids, and phytosterols because of their antioxidant and/or anti-inflammatory properties.

The principal fatty acids present in awara pulp oil were oleic (63.5%) and palmitic (25%) acids (Table 1); other fatty acids detected were α -linolenic (3.5%), stearic (2.4%), and linoleic (1.4%) acids. Awara pulp oil is richer in unsaturated fatty acids than palm oil, thus more comparable to olive oil. Our results are in agreement with already published data (Oboh & Oderinde, 1988; Lubrano, Robin, & Khaiat, 1994). It contains a percentage of unsaponifiable matter ($0.75 \pm 0.02\%$) similar to that of *Euterpe oleracea* (1.5%), *Elaeis oleifera* (2.1%), *Bactris gasipaes* (0.5%), or other palm fruits studied by Lubrano *et al.* (Lubrano *et al.*, 1994).

Table 1: Fatty acid identification and quantification of awara pulp oil determined by GC-MS.

Fatty acids	Formula	Relative percentage of total fatty acids ^{a)}
palmitic acid	C16:0	25 \pm 0.5
stearic acid	C18:0	2.4 \pm 0.2
oleic acid	C18:1 (n-9)	63.5 \pm 0.9
cis-vaccenic acid	C18:1 (n-7)	1.2 \pm 0.1
linoleic acid	C18:2 (n-6)	1.3 \pm 0.1
α -linolenic acid	C18:3 (n-3)	3.5 \pm 0.3

a) Mean of three independent determinations \pm sem.

Then, we analyzed awara pulp oil for tocopherol content. With $142.4 \pm 5.1 \mu\text{g}$ of α -tocopherol and $5.6 \pm 0.2 \mu\text{g}$ of β -tocopherol for 1 g of oil (n=3), awara pulp oil is more comparable with *Bactris gasipaes* or *Oenocarpus bacaba* than *Elaeis oleifera*, which is mainly composed of tocotrienols (Lubrano *et al.*, 1994).

Unsaponifiable extract was analysed by HPLC-DAD and HPLC-MS for tentative identification and quantification of carotenoids (Table 2). To our knowledge, the carotenoid composition of awara pulp oil has not been previously reported.

Phytoene. Peak 3 was identified as phytoene by comparing the UV spectra with the literature (G. Britton *et al.*, 2004) and the mass spectra showed the molecular ion at m/z 545.

Phytofluene. Peaks 5 and 10 were identified as *cis*-phytofluene and *all-trans*-phytofluene respectively. These two peaks showed the same molecular ion at m/z 543 and the same maximum wavelengths. The identification was made through the % III/II, which was higher for the *all-trans* isomer (83%) than for the *cis* (64%). The elution order was confirmed by the literature (De Rosso & Mercadante, 2007).

ζ -carotene isomers. Peaks 14, 17, and 19 were identified as ζ -carotene by the molecular ion at m/z 541 and their UV-spectra.

α-carotene isomers. Peak 8 was identified as *cis-α-carotene* by the *cis* peak at 331 nm and the molecular ion at m/z 537, and peak 15 was identified as *all-trans-α-carotene*.

β-carotene isomers. Peaks 11, 13, and 16 were identified as 15-*cis*, 13-*cis*, and *all-trans-β-carotene* respectively through UV-spectra, elution order, and mass spectra. All the isomers showed a molecular ion at m/z 537. For *all-trans-β-carotene*, a standard injection confirmed the identification. The all *cis* isomers showed a *cis* peak at 338 nm, and the elution order was confirmed by the literature (De Rosso & Mercadante, 2007).

δ-carotene isomers. Peaks 21 and 24 were identified as *cis-δ-carotene* and *all-trans-δ-carotene* respectively by their UV-spectra, molecular ion at m/z 537 and *cis* peak at 350 nm for peak 21.

γ-carotene isomers. Peaks 25 and 26 were identified as *γ-carotene* through a molecular ion at m/z 537 and the UV-spectra.

The principal carotenoids present were *β-carotene* isomers (Table 2); *all-trans-β-carotene* represented almost 45.6% of the total carotenoid content, followed by 13-*cis-β-carotene* (12.4%), and 15-*cis-β-carotene* (2.2%). *ζ-carotene*, *phytoene*, and *phytofluene* isomers represented 9.2%, 8.2%, and 4.3% respectively of the total carotenoid content. The total amount of carotenoids was $1\,637.1 \pm 71.9$ µg of *β-carotene* equivalent for 1 g of awara pulp oil, which is ten-fold higher than in already published data (Oboh & Oderinde, 1988). This variation might be explained by differences in the origin or maturity of fruit, and by a different extraction protocols. Carotenoid content of awara pulp oil is also two-fold higher than for palm oil (Sambanthamurthi, Sundram, & Tan, 2000).

Table 2: Carotenoid identification and quantification of awara pulp oil determined by HPLC-DAD-MS of the unsaponifiable extract.

N°	RT ^{a)}	λ_{max} (nm)				%	%	[M+H] ⁺	Tentative	Content ^{b)}
Peak	(min)	cis	peak I	peak II	peak III	III/II	A _B /II	(m/z)	identification	($\mu\text{g/g}$)
1	27.1	330	406	436	468	nc ^{c)}	nc	nd ^{d)}	ni ^{e)}	3.4 ± 0.5
2	28		406	430	469	nc	0	nd	ni	3.1 ± 0.3
3	28.1		276	286	299	0	0	545	phytoene	133.9 ± 15.0
4	29.01		414	438	476	11	0	nd	ni	9.6 ± 2.9
5	29.98		332	348	367	64	0	543	cis-phytofluene	61.7 ± 6.0
6	30.15		422	446	472	17	0	553	ni	20.9 ± 0.2
7	30.81	331	420	440	466	nc	nc	nd	ni	7.6 ± 0.6
8	31.31	332	416	438	466	8	27	537	cis- α -carotene	6.0 ± 0.2
9	32.2		414	438	462	nc	0	nd	ni	19.6 ± 1.3
10	32.22		332	348	368	108	0	543	all-trans-phytofluene	9.3 ± 1.5
11	32.62	337	421	448	472	nc	52	537	15-cis- β -carotene	36.2 ± 2.9
12	32.9-33.2							537	mixture	38.4 ± 1.3
13	33.74	338	421	444	468	nc	46	537	13-cis- β -carotene	202.9 ± 10.4
14	34.1		379	400	424	109	0	541	ζ -carotene 1	36.8 ± 3.5
15	34.91		422	446	474	52	0	537	all-trans- α -carotene	40.4 ± 3.3
16	37.35		422	450	478	17	0	537	all-trans- β -carotene	747.7 ± 114.4
17	38.15		379	400	424	114	0	541	ζ -carotene 2	93.7 ± 10.0
18	38.6-38.8							539/537	mixture (zeacarotene)	72.2 ± 3.3
19	39.5		380	400	426	nc	0	541	ζ -carotene 3	20.9 ± 2.0
20	39.6							537	mixture	26.1 ± 1.4
21	42.2	350	432	454	482	nc	47	537	cis- δ -carotene	1.5 ± 0.7
22	43.5		410	434	460	92	0	nd	ni	3.0 ± 0.3
23	43.89		411	438	462	nc	0	nd	ni	4.1 ± 0.9
24	44.15		432	458	484	nc	0	537	all-trans- δ -carotene	5.1 ± 0.7
25	48.49		438	461	490	30	0	537	γ -carotene 1	13.5 ± 0.5
26	49.04		436	462	491	29	0	537	γ -carotene 2	19.4 ± 0.8
Total carotenoids										1 637.1 ± 71.86

a) RT, retention time; b) Mean of three independent determinations ± sem, expressed as μg of β -carotene equivalent per g of awara pulp oil; c) nc, not calculated; d) nd, not detected; e) ni, not identified.

GC-MS analyses allowed identification and quantification of phytosterols (Table 3). Campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, and isofucosterol have already been detected in awara pulp oil (Lubrano *et al.*, 1994) and cycloartenol and 24-methylenecycloartanol have already been detected in kernel oil from awara (Bereau, Benjelloun-Mlayah, Banoub, & Bravo, 2003). Arundoin (fern-9(11)-en-3 β -ol methyl ether) is a triterpene methyl ether that differs from fern-9(11)-en-3 β -ol only by the methyl ether group. To our knowledge, identification of squalene, cycloeucalenol, arundoin, and fer-9(11)-en-3 β -ol have not been previously reported for phytosterol composition of awara pulp oil. The total content of phytosterols was 1 497.2 ± 90.1 μg of 5 α -cholestane-3 β -ol equivalent for 1 g of awara pulp oil, and β -sitosterol and arundoin represented 32.6% and 16.2% respectively of the total phytosterols. Relative percentage of phytosterols agrees with already published data (Lubrano *et al.*, 1994) and real content is comparable with phytosterol palm oil content (Sambanthamurthi *et al.*, 2000).

Table 3: Phytosterol identification and quantification of awara pulp oil determined by GC-MS of the unsaponifiable extract.

N° peak	RT ^{a)}	Tentative identification	Content (µg/g) ^{b)}
1	6.3	Squalene ^{c)}	58.8 ± 8.5
2	12.9	Campesterol ^{d)}	133.2 ± 4.2
3	13.7	Stigmasterol ^{d)}	66.1 ± 5.0
4	14.1	ni ^{e)}	86.9 ± 4.2
5	14.4	ni	43.4 ± 5.3
6	15.2	β-sitosterol ^{d)}	488.2 ± 23.8
7	15.5	Isofucosterol ^{f)}	45.5 ± 2.6
8	15.8	ni	41.1 ± 5.0
9	15.9	Cycloeucalenol ^{g)}	63.5 ± 5.5
10	16.4	Arundoin ^{c)}	241.9 ± 11.6
11	16.9	Cycloartenol ^{d)}	170.3 ± 16.7
12	18.6	24-methylenecycloartanol ^{c)}	20.4 ± 3.8
13	19.3	fern-9(11)-en-3β-ol ^{f)}	37.8 ± 6.0
Total phytosterol			1 497.2 ± 90.1

a) Retention time (min); b) Mean of three independent determinations ± sem, expressed as µg of 5α-cholestane-3β-ol equivalent per 1 g of awara pulp oil; c) 90% match with NIST database; d) Standard co-elution; e) ni, not identified; f) Tentative identification.

3.2 Anti-inflammatory properties in LPS-induced endotoxic shock in mice

Chemical composition of awara pulp oil has revealed the presence of several molecules possessing antioxidant and/or anti-inflammatory properties such as carotenoids (Krinsky & E. Johnson, 2005), phytosterols (Navarro *et al.*, 2001), and tocopherols (Singh & Devaraj, 2007). So, we decided to evaluate awara pulp oil for potential anti-inflammatory activities *in vivo*. As model of acute inflammation, we studied the effect of awara pulp oil on cytokine production in LPS-induced endotoxic shock.

Septic shock is a serious clinical problem with high mortality resulting from a multitude of systemic and cellular processes and overproduction of inflammatory mediators, leading to multiple organ failure. LPS, a Gram-negative bacterial endotoxin, is a potent activator of the immune system, inducing many inflammatory mediators such as TNFα and IL-6 that are implicated in the early phase of endotoxic shock. TNFα is one of the most important pro-inflammatory cytokines involved in endotoxic shock, and IL-6 has both pro- and anti-inflammatory activities in acute inflammation. IL-10 is also induced during endotoxic shock and is considered the most potent immuno-suppressive and anti-inflammatory cytokine able to inhibit major pro-inflammatory cytokine productions such as IL-1, IL-6, and TNFα (Annane, Bellissant, & Cavaillon, 2005).

As expected in our model, LPS induced a strong and significant production of TNF α , IL-6, and IL-10 in serum but with different kinetics depending on cytokine. As compared to control, TNF α production (Figure 1A) significantly increased at 1.5 h, and subsequently decreased to reach the control values at 6 h. IL-6 production (Figure 1B) significantly and gradually increased from 1.5 h to 6 h and IL-10 production significantly increased (Figure 1C) at 1.5 h to decrease at 6 h. Awara pulp oil treatment attenuated the increase in serum TNF α by 79% at 1.5 h and IL-6 by 35% at 6 h, and it induced a 70% increase in serum IL-10 at 1.5 h as compared to LPS-treated mice. This indicates that awara pulp oil attenuates LPS-induced endotoxic shock not only by attenuating TNF α and IL-6 pro-inflammatory cytokine production but also by enhancing anti-inflammatory IL-10 production, as a host-protective response against inflammation.

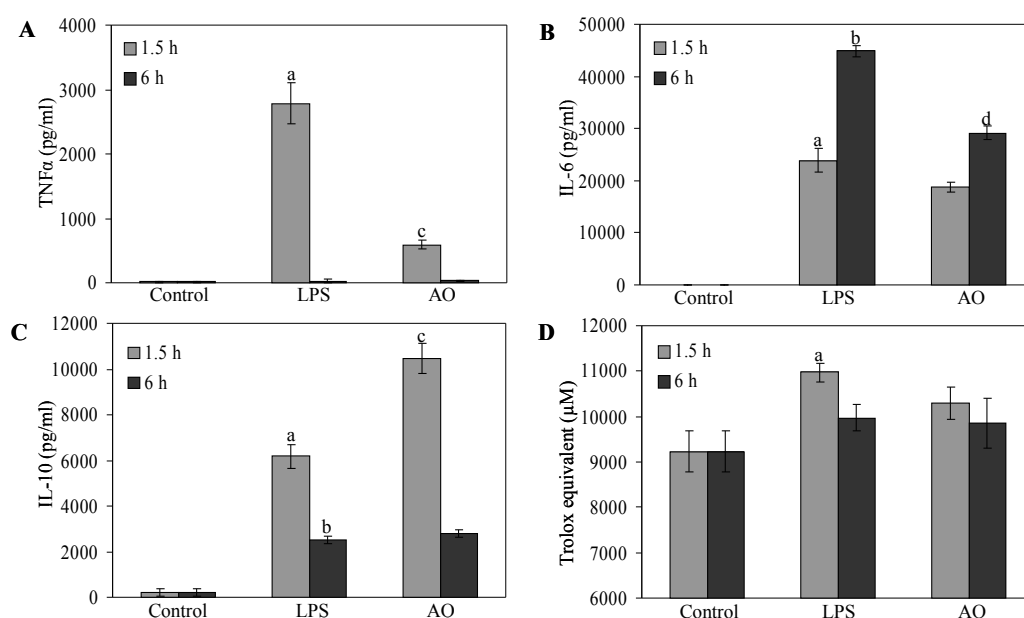


Figure 1: Effect of awara pulp oil on serum cytokine productions and antioxidant capacity in LPS-induced endotoxic shock in mice.

Mice were pre-treated with awara pulp oil (AO) (5 mL/Kg oral) 24 h and 2 h before LPS injection (20 mg/Kg IP). TNF α (A), IL-6 (B), and IL-10 (C) were measured by ELISA in serum and antioxidant capacities of serum (D) were measured by ORAC method. Values are mean \pm sem ($n=8$); a, b, c, and d: $p < 0.05$ vs Control 1.5 h, Control 6 h, LPS 1.5 h, and LPS 6 h respectively.

Furthermore, we measured the cytokine productions in different tissues (Table 4). Following LPS injection, a strong and significant increase in TNF α production appeared at 1.5 h in spleen and lung. IL-6 production was also increased in all studied tissues but with different kinetics. Indeed, the IL-6 production was higher at 1.5 h in spleen and liver whereas it was higher at 6 h in kidney and lung. LPS injection also weakly increased IL-10 production in spleen at 1.5 h and in lung at 6 h. Awara pulp oil treatment induced a significant decrease in TNF α production in spleen

(21%) and lung (41%) at 1.5 h. It also induced a weak but significant decrease in IL-6 production at 6 h in spleen (29%) and in lung (16%), but induced a strong and significant increase in IL-10 production at 1.5 h in spleen (67%), lung (29%), and kidney (24%).

Table 4: Effect of awara pulp oil treatment on cytokine production in different tissues in LPS-induced endotoxic shock in mice^{a)}.

Cytokines (pg/mg of proteins)		Control	LPS 1.5 h	AO 1.5 h	LPS 6 h	AO 6 h
TNF α	Spleen	15 \pm 15	255 \pm 6 ^{b)}	202 \pm 12 ^{c)}	19 \pm 4	27 \pm 10
	Liver	34 \pm 4	61 \pm 3 ^{b)}	58 \pm 2	51 \pm 3 ^{b)}	48 \pm 2
	Kidney	20 \pm 6	31 \pm 3	18 \pm 6	11 \pm 2	36 \pm 4 ^{d)}
	Lung	37 \pm 5	111 \pm 9 ^{b)}	66 \pm 4 ^{c)}	65 \pm 6 ^{b)}	64 \pm 9
IL-6	Spleen	nd ^{e)}	295 \pm 22 ^{b)}	320 \pm 20	135 \pm 8 ^{b)}	96 \pm 15 ^{d)}
	Liver	44 \pm 4	119 \pm 4 ^{b)}	115 \pm 6	87 \pm 3 ^{b)}	105 \pm 11
	Kidney	nd	147 \pm 7 ^{b)}	181 \pm 8 ^{c)}	336 \pm 16 ^{b)}	331 \pm 21
	Lung	10 \pm 2	207 \pm 12 ^{b)}	232 \pm 21	442 \pm 20 ^{b)}	372 \pm 18 ^{d)}
IL-10	Spleen	117 \pm 4	159 \pm 9 ^{b)}	266 \pm 11 ^{c)}	121 \pm 4	115 \pm 3
	Liver	115 \pm 3	102 \pm 3 ^{b)}	108 \pm 4	121 \pm 4	104 \pm 4 ^{d)}
	Kidney	83 \pm 5	84 \pm 3	104 \pm 3 ^{c)}	80 \pm 3	98 \pm 4 ^{d)}
	Lung	130 \pm 3	126 \pm 5	157 \pm 4 ^{c)}	166 \pm 4 ^{b)}	162 \pm 5

a) Mice were pretreated with awara pulp oil (AO) (5 mL/Kg oral) 24 h and 2 h before LPS injection (20 mg/Kg IP).

TNF α , IL-6, and IL-10 were measured by ELISA in spleen, liver, kidney, and lung. Values are mean \pm sem (n=7): b),

c), d) $p < 0.05$ vs Control, LPS 1.5 h, and LPS 6 h respectively; e) nd, not detected.

The effects of awara pulp oil treatment on cytokine productions in endotoxic shock are similar to previous studies with β -carotene or tocopherol. For example, Bai *et al.* (Bai *et al.*, 2005) showed that a β -carotene treatment (10 mg/Kg) decreases inflammatory mediators, including TNF α in endotoxic shock model. Another study showed that a diet enriched with coenzyme Q(9), α -tocopherol, and β -carotene also reduced inflammation response in mice by decreasing pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL-6) but had no effect on IL-10 production (E. Novoselova *et al.*, 2009). Leite *et al.* (Leite *et al.*, 2005) showed that diets enriched with olive or canola oil decrease serum TNF α production in LPS-induced endotoxic shock as compared to sesame or soybean oil.

Septic shock is associated with increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses. Thus, because antioxidant supplementation is potentially useful in the management of septic shock (Galley, Howdle, Walker, & Webster, 1997), we also measured the antioxidant capacity of serum. LPS-treated mice showed a significant increase (16%) in antioxidant capacity at 1.5 h, which subsequently decreased at 6 h (Figure 1D). Awara pulp oil treatment appeared to decrease the serum antioxidant capacity at 1.5 h but not significantly.

This *in vivo* experiment showed for the first time that awara pulp oil modulate the cytokine productions induced by LPS injection depending on timing with strongest effects in serum, spleen, and lung, by decreasing IL-6 and TNF α and increasing IL-10 productions. These effects may be attributed to identified compounds, phytosterols, carotenoids, and tocopherols possessing antioxidant and/or anti-inflammatory properties and suggest that awara pulp oil should have anti-inflammatory properties *in vivo*.

3.3 Anti-inflammatory properties in ovalbumin-sensitized rats

To confirm the anti-inflammatory properties of awara pulp oil observed in the first experiment, we also used an *in vivo* model of chronic inflammation. We assessed the effect of awara pulp oil on airway inflammation in a model of ovalbumin-sensitized rats.

Asthma is a global health problem that results from complex interplay between genetic and environmental factors and affects over 300 million people worldwide. It is a chronic inflammatory disorder of lung promoted by Th2 type immune response and characterized by airway obstruction, bronchial hyper-responsiveness, and migration of inflammatory cells, principally of eosinophils and lymphocytes associated to an excessive oxidative stress (Bousquet, Jeffery, Busse, M. Johnson, & Vignola, 2000). Epidemiological studies have suggested associations between low dietary antioxidant intake and increased respiratory symptoms in asthmatics (Allen *et al.*, 2009). A higher dietary antioxidant intake might protect against oxidative damage and therefore alleviate airway inflammation.

In our study, ovalbumin sensibilization induced a significant increase in BALF total cells as compared to control (Figure 2A), and awara pulp oil treatment induced a significant decrease (28% for AO and 27% for AIP administrations) administration. Analysis of leukocyte sub-populations showed a strong increase in macrophages, eosinophils, and lymphocytes induced by ovalbumin (Figure 2B). Awara pulp oil treatment induced a strong and significant decrease in eosinophils (45% for AO and 61% for AIP administrations), and in lymphocytes (46% for AO and 50% for AIP administration) as compared to ovalbumin-sensitized rats. It had no effect on macrophages, and induced a weak but significant increase in neutrophils by IP administration.

Oxidative stress has been implicated in the severity of allergic airways symptoms, and ROS produced by inflammatory cells are thought to act as underlying factors in enhancing bronchial hypersensitivity, and mucus secretion. To fight against ROS, endogenous antioxidant mechanisms are both enzymatic and non-enzymatic. Modulation of antioxidant enzymes such as superoxide

dismutase, catalase, thioredoxins, or glutaredoxins (Comhair & Erzurum, 2010), that eliminate these ROS as part of the body's defense mechanism, have already been described in asthma patients or in asthma models. A study has also shown an increased level of total antioxidant capacity in asthmatic children in response to increase in oxidative status (Cakmak *et al.*, 2009). In our study, we showed that ovalbumin induced a significant increase in BALF antioxidant capacity (Figure 2C) and three hundred times higher in serum (Figure 2D), which may reflect a response of antioxidant mechanisms to an increase in oxidative stress. Awara pulp oil treatment induced a significant inhibition of BALF antioxidant capacity (28% for AO and 42% for AIP administration) and serum antioxidant capacity (11% for AO and AIP administration) compared to sensitized rats. This effect can be explained by inhibition of inflammatory cells and thus decreased ROS production, which induces a lower response by antioxidant mechanisms.

Proteins in BALF were also significantly increased in ovalbumin-sensitized rats as compared to control (Figure 2E), and awara pulp oil treatment induced a weak decrease (20% for AO and 23% for AIP administration). EPO activity also appeared induced in BALF but with no significance due to high variability between animals (Figure 2F). Nevertheless it confirmed the presence of eosinophils in BALF of ovalbumin-sensitized rats. Awara pulp oil induced an inhibition of BALF EPO activity as compared to ovalbumin-sensitized rats but not significantly. These results suggest that awara pulp oil might alleviate excess of overexpressed proteins that may damage epithelial lining and induce airway inflammation. Both oral and IP administration showed the same efficacy in decreasing ovalbumin-induced pulmonary inflammation, nevertheless IP administration was more effective in decreasing eosinophils number in BALF than oral route.

This pulmonary inflammatory model allowed us to confirm the anti-inflammatory properties of awara pulp oil. Identified molecules have already shown beneficial effects in similar models and epidemiological studies have suggested associations between low dietary antioxidant intake and asthma severity. Higher concentrations of vitamin E intake have beneficial effects in asthma model (Okamoto *et al.*, 2006), β -carotene has beneficial effects in allergic model (Sato *et al.*, 2004) and β -sitosterol inhibits bronchial inflammation in asthma model (Yuk *et al.*, 2007). Thus, carotenoids, phytosterols, and tocopherols present in awara pulp oil might be partly responsible for anti-inflammatory properties in this chronic inflammatory model.

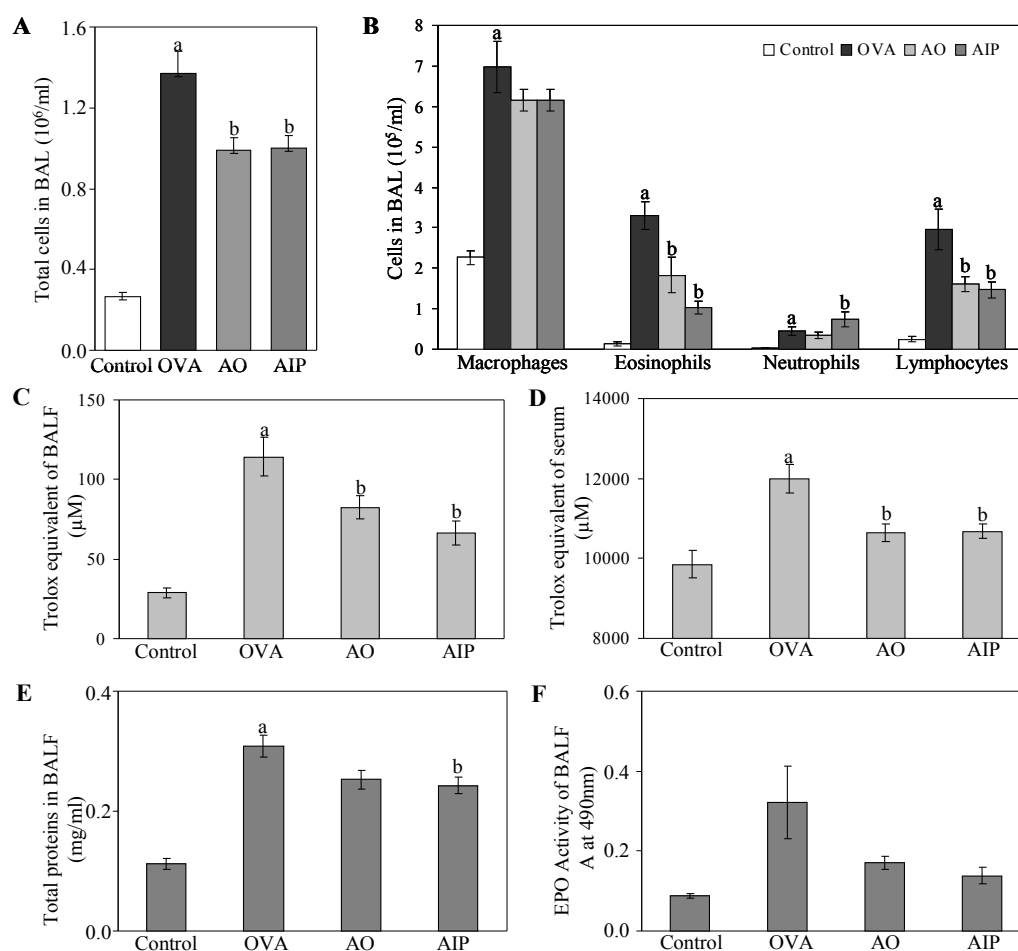


Figure 2: Effect of awara pulp oil on total cells (A), leukocyte sub-populations (B), BALF (C) and serum (D) antioxidant capacity, BALF total proteins (E), and BALF EPO activity (F) in BALF of ovalbumin-sensitized rats.

Controls were non-sensitized rats. OVA were ovalbumin-sensitized rats. Ovalbumin-sensitized rats were treated with awara pulp oil (0.5 mL/rat) by oral (AO) or IP administration (AIP). Cells were measured by differential cell counts from stained cytopsin preparations, antioxidant capacity were measured by ORAC method, proteins were measured by Bradford method, and EPO activity by oxidation of OPD. Values are mean \pm sem (n=8); a and b: $p < 0.05$ vs Control and OVA respectively.

4 Conclusion

In the first part of this study we determined tocopherol, carotenoid, and phytosterol contents with β -carotene and β -sitosterol as major compounds of awara pulp oil. Carotenoid and phytosterol analysis allowed us to identify molecules such as phytoene, phytofluene, and arundoin that have never been detected in awara pulp oil before.

To assess the possible anti-inflammatory effects of awara pulp oil *in vivo*, we have used two different inflammatory models. In LPS-induced endotoxic shock in mice, awara pulp oil

modulated cytokine productions by decreasing pro-inflammatory ($\text{TNF}\alpha$, IL-6) and increasing anti-inflammatory (IL-10) cytokines, showing that awara pulp oil can positively influence the mechanism of acute inflammatory response *in vivo*. We have confirmed the anti-inflammatory properties of awara pulp oil in a sensitized rat model of pulmonary chronic inflammation. Treatment significantly inhibited the number of inflammatory cells, particularly eosinophils and lymphocytes in the BALF of sensitized rats. Septic shock and asthma are both associated with oxidative stress. We showed that inflammation induced by ovalbumin or LPS is associated with an increase in antioxidant capacity of serum or BALF, and that awara pulp oil treatment inhibits this increase.

These results showed that awara pulp oil improves both inflammatory cytokine production in endotoxic shock model and inflammatory cell influx in asthma model. These anti-inflammatory properties may be attributed to the presence of carotenoids, phytosterols, and tocopherols identified in awara pulp oil. We are currently studying anti-inflammatory properties of the unsaponifiable fraction to confirm the potential involvement of such molecules in the biological effects exhibited by awara pulp oil. Mechanisms involved may be related to inhibition of oxidative stress by such antioxidant molecules and thus alleviated inflammatory response and/or may be due to direct anti-inflammatory properties. Because the intake of fruit and vegetables that are a good source of carotenoids, phytosterols, tocopherols, and polyphenols, is associated with the prevention of several diseases, we conclude that consumption of awara fruit may have potential preventive effects on several inflammatory diseases.

Acknowledgements

The authors thank N. Barouh and G. Piombo (CIRAD, UMR IATE) for their help in this study.

References

- Allen, S., Britton, J. R., & Leonardi-Bee, J. A. (2009). Association between antioxidant vitamins and asthma outcome measures: systematic review and meta-analysis. *Thorax*, 64(7), 610-619.
- Annane, D., Bellissant, E., & Cavaillon, J. M. (2005). Septic shock. *The Lancet*, 365(9453), 63-78.

- Bai, S., Lee, S., Na, H., Ha, K., Han, J., Lee, H., Kwon, Y., *et al.* (2005). β -Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF- κ B activation. *Experimental and Molecular Medicine*, 37(4), 323-334.
- Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, Q., & Bernard, P. (2002). Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 82, 155-158.
- Bereau, D., Benjelloun-Mlayah, B., Banoub, J., & Bravo, R. (2003). FA and Unsaponifiable Composition of Five Amazonian Palm Kernel Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(1), 49-53.
- Bernard, P., Scior, T., Didier, B., Hibert, M., & Berthon, J. (2001). Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A2 inhibitors. *Phytochemistry*, 58, 865-874.
- Bester, D., Esterhuyse, A. J., Truter, E. J., & Van Rooyen, J. (2010). Cardiovascular effects of edible oils: a comparison between four popular edible oils. *Nutrition Research Reviews*, 1-15.
- Bousquet, J., Jeffery, P. K., Busse, W. W., Johnson, M., & Vignola, A. M. (2000). Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161(5), 1720-1745.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2004). *Carotenoids Handbook* (Birkhauser.). Basel, Switzerland.
- Cakmak, A., Zeyrek, D., Atas, A., Celik, H., Aksoy, N., & Erel, O. (2009). Serum prolidase activity and oxidative status in patients with bronchial asthma. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23(2), 132-138.
- Calder, P. C., Albers, R., Antoine, J., Blum, S., Bourdet-Sicard, R., Ferns, G. A., Folkerts, G., *et al.* (2009). Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. *British Journal of Nutrition*, 101(Supplement S1), 1-45.
- Cavalcante, P. B. (1977). Edible Palm Fruits of the Brazilian Amazon. *Principes*, 21, 91-103.
- Comhair, S. A. A., & Erzurum, S. C. (2010). Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(1), 93-124.

- De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5062-5072.
- Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., & Loguercio, C. (2007). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 121(11), 2381-2386.
- Galley, H. F., Howdle, P. D., Walker, B. E., & Webster, N. R. (1997). The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. *Free Radical Biology & Medicine*, 23(5), 768-774.
- Halayko, A. (2003). Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 137(2-3), 209-222.
- Kahn, F. (2008). The genus *Astrocaryum* (Arecaceae). *Revista Peruana de Biología*, 15, 031-048.
- Krinsky, N., & Johnson, E. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(6), 459-516.
- Leite, M. S., Pacheco, P., Gomes, R. N., Guedes, A. T., Castro-Faria-Neto, H. C., Bozza, P. T., & Koatz, V. L. G. (2005). Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet. *Shock*, 23(2), 173-178.
- Loizou, S., Lekakis, I., Chrousos, G. P., & Moutsatsou, P. (2010). β -sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(4), 551-558.
- Lubrano, C., Robin, J., & Khaiat, A. (1994). Composition en acides gras, stérols et tocophérols d'huiles de pulpe de fruits de six espèces de palmiers de Guyane. *Oléagineux*, 49(2), 59-65.
- Navarro, A., De Las Heras, B., & Villar, A. (2001). Anti-Inflammatory and Immunomodulating Properties of a Sterol Fraction from *Sideritis foetens* CLEM. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24(5), 470-473.

- Novoselova, E., Lunin, S. M., Novoselova, T. V., Khrenov, M. O., Glushkova, O. V., Avkhacheva, N. V., Safronova, V. G., *et al.* (2009). Naturally occurring antioxidant nutrients reduce inflammatory response in mice. *European Journal of Pharmacology*, 615(1-3), 234-240.
- Oboh, F., & Oderinde, R. (1988). Analysis of Pulp and Pulp Oil of the Tucum (*Astrocaryum vulgare* Mart.) Fruit. *Food Chemistry*, (30), 277-287.
- Okamoto, N., Murata, T., Tamai, H., Tanaka, H., & Nagai, H. (2006). Effects of α -tocopherol and probucol supplements on allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of allergic asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, 141(2), 172-180.
- Sambanthamurthi, R., Sundram, K., & Tan, Y. (2000). Chemistry and biochemistry of palm oil. *Progress in Lipid Research*, 39, 507-558.
- Sato, Y., Akiyama, H., Suganuma, H., Watanabe, T., Nagaoka, M. H., Inakuma, T., Goda, Y., *et al.* (2004). The feeding of β -carotene down-regulates serum IgE levels and inhibits the type I allergic response in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(7), 978-984.
- Singh, U., & Devaraj, S. (2007). Vitamin E: inflammation and atherosclerosis. *Vitamins and Hormones*, 76, 519-549.
- Yuk, J. E., Woo, J. S., Yun, C., Lee, J., Kim, J., Song, G., Yang, E. J., *et al.* (2007). Effects of lactose- β -sitosterol and β -sitosterol on ovalbumin-induced lung inflammation in actively sensitized mice. *International Immunopharmacology*, 7(12), 1517-1527.

I.4 Conclusion

La première partie de cette étude a consisté en la caractérisation chimique de l'huile de pulpe d'awara. L'analyse de la composition en acides gras a montré une forte teneur en acide oléique (63,5 %) comparée à l'acide palmitique (25 %), l'huile de pulpe est donc majoritairement constituée d'acides gras mono-insaturés. L'extrait insaponifiable qui représente 0,75 % de l'huile de pulpe correspond aux molécules non saponifiables de l'huile telles que les caroténoïdes, les phytostérols et les tocophérols ; nous en avons également étudié la composition. L'analyse des tocophérols a permis de détecter les isomères α et β , l' α -tocophérol étant l'isomère majoritaire et la teneur totale en tocophérols de l'huile de pulpe s'élevant à 148,0 $\mu\text{g/g}$. L'analyse des caroténoïdes a permis de détecter des précurseurs ainsi que différents isomères de caroténoïdes. Le phytoène ainsi que les isomères *cis* et *trans* du phytofluène, précurseurs de la synthèse des caroténoïdes, ont été détectés ainsi que différents isomères *cis* et *trans* des carotènes ζ , α , β , δ et γ . Les isomères du β -carotène représentent la majorité des caroténoïdes détectés, l'isomère *all-trans*- β -carotène représentant 45,6 % de la teneur en caroténoïdes totaux, celle-ci s'élevant à 1637,1 μg d'équivalent β -carotène/g d'huile de pulpe. L'analyse des phytostérols a permis l'identification du squalène, précurseur des phytostérols ainsi que de stérols (campestérol, stigmastérol, β -sitostérol, isofucostérol), d'alcools triterpéniques (cycloarténol, 24-méthylèncycloartanol, fern-9(11)-en-3 β -ol), de 4-méthylstérols (cycloeucalénol) et d'un éther de méthyl triterpène (arundoin). La teneur totale en phytostérols est de 1497 μg d'équivalent 5 α -cholestane-3 β -ol/g d'huile de pulpe, le β -sitostérol représentant 32,6 % et l'arundoin 16,2 % des phytostérols totaux.

Les différentes classes de molécules identifiées possèdent des propriétés antioxydantes et/ou anti-inflammatoires. Nous avons donc dans un deuxième temps, étudié les propriétés anti-inflammatoires de l'huile de pulpe dans deux modèles d'inflammation : le choc endotoxique et l'inflammation bronchique chronique.

Le modèle de choc endotoxique chez la souris nous a permis de mettre en évidence un effet anti-inflammatoire de l'huile de pulpe administrée par voie orale par mesure de différentes cytokines inflammatoires. Le traitement a été réalisé en deux fois, 24h et 2h avant l'injection de LPS, afin d'explorer à la fois l'effet d'une administration directe de l'huile de pulpe d'awara et d'une administration prenant en compte le métabolisme des différents constituants de l'huile. Le traitement par l'huile de pulpe inhibe la production de TNF α et d'IL-6 sérique, cytokines

pro-inflammatoires produites lors de l'induction du choc endotoxique par injection de LPS. A l'inverse, le traitement par l'huile de pulpe augmente la production d'IL-10 sérique qui est une cytokine anti-inflammatoire. Nous avons également pu mettre en évidence une inhibition de la production d'IL-6 et de $\text{TNF}\alpha$ ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-10 principalement dans la rate et les poumons. De même, une augmentation de la capacité antioxydante totale du sérum en réponse à l'injection de LPS a été observée, ce phénomène traduit une augmentation des réponses antioxydantes de l'organisme face à l'induction du choc endotoxique. Le traitement par l'huile de pulpe d'awara inhibe cette augmentation de la capacité antioxydante totale du sérum mais de manière non significative. Ces résultats vont dans le sens d'une inhibition de l'induction de l'inflammation et donc d'une réponse moindre des systèmes antioxydants de l'organisme. Ces premiers résultats suggèrent que l'administration préventive d'huile de pulpe d'awara peut efficacement lutter contre une réponse inflammatoire aiguë *in vivo*.

Le modèle d'œdème à la carragénine n'a pas permis de mettre en évidence d'effet anti-inflammatoires de l'huile de pulpe contrairement au modèle de choc endotoxique. Les mécanismes inflammatoires induits sont différents dans ces deux modèles. L'injection sub-plantaire de carragénine induit une réaction inflammatoire locale principalement par la libération d'histamine, de sérotonine, de bradikinine, d'éicosanoïdes et de radicaux libres ; l'injection de LPS par voie IP induit une réaction inflammatoire systémique médiée principalement par la production de cytokines ($\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β). Les effets observés de l'huile de pulpe d'awara semblent être différents en fonction des mécanismes inflammatoires déclenchés.

La différence de traitement dans ces deux modèles peut également expliquer ces résultats. En effet, dans le modèle d'œdème à la carragénine, l'huile de pulpe a été administrée une seule fois à la dose de 5 mL/Kg et simultanément à l'induction de l'œdème alors que dans le modèle de choc endotoxique, elle a été administrée préventivement à la même dose 24h et 2h avant l'injection de LPS. D'autres expérimentations seraient donc nécessaires afin d'expliquer les mécanismes anti-inflammatoires impliqués. L'administration en prévention de l'huile de pulpe d'awara dans le modèle d'œdème à la carragénine (24h et 2h avant) permettrait de déterminer un effet anti-inflammatoire par inhibition de la libération des amines vasoactives et de la formation de kinines impliquées dans la phase vasculo-exsudative, ainsi que des éicosanoïdes.

Le modèle d'inflammation bronchique chez le rat nous a permis de confirmer l'effet anti-inflammatoire de l'huile de pulpe dans un modèle d'inflammation chronique. L'afflux de cellules inflammatoires, en particulier d'éosinophiles et de lymphocytes, induit par la

sensibilisation à l'ovalbumine au niveau bronchique a été inhibé par l'huile de pulpe. Nous avons également pu mettre en évidence une augmentation de la capacité antioxydante du sérum et du BALF induite par l'ovalbumine, effet identique à celui retrouvé dans le modèle de choc endotoxique. Le traitement par l'huile de pulpe inhibe significativement cette capacité antioxydante à la fois dans le sérum et le BALF. Ce phénomène est probablement dû à la capacité d'inhibition de l'inflammation bronchique par l'huile de pulpe d'awara ce qui entraîne une réponse antioxydante moindre de l'organisme vis-à-vis de la sensibilisation à l'ovalbumine. De plus, une diminution du taux de protéines totales du BALF a été observée. L'activité EPO est également augmentée dans les BALF des animaux sensibilisés mais de façon non significative du fait de la variabilité entre les animaux, cela confirme néanmoins l'afflux d'éosinophiles au niveau bronchique induit par la sensibilisation à l'ovalbumine.

L'huile de pulpe a montré un effet bénéfique à la fois sur la production de cytokines inflammatoires dans le modèle de choc endotoxique ainsi que sur l'afflux de cellules inflammatoires dans le modèle d'inflammation bronchique. La consommation d'huile de pulpe d'awara pourrait donc prévenir le développement de différentes pathologies inflammatoires. Ces effets sont potentiellement attribuables à la présence des caroténoïdes, phytostérols et tocophérols identifiés dans l'huile de pulpe d'awara, molécules décrites comme ayant des propriétés antioxydantes et/ou anti-inflammatoires. Ces différentes classes de molécules constituent l'insaponifiable de l'huile. Suite à ces premiers résultats, nous avons donc décidé d'étudier les propriétés anti-inflammatoires de la fraction insaponifiable ce qui permettrait d'expliquer en partie les effets biologiques de l'huile de pulpe d'awara.

II Composition chimique et propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes de la fraction insaponifiable

Les premiers travaux réalisés ont pu mettre en évidence les propriétés anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara administrée préventivement dans deux modèles animaux d'inflammation. Nous avons émis l'hypothèse que les effets observés étaient potentiellement liés aux molécules non saponifiables de l'huile de pulpe d'awara. En effet, les microconstituants de l'insaponifiable ont été décrits comme en partie responsable des effets santé des huiles végétales (Bester *et al.*, 2010) comme l'huile d'olive (Moreno, 2003) ou l'huile de palme (Sambanthamurthi *et al.*, 2000). Nous avons donc étudié les propriétés anti-inflammatoires de la fraction insaponifiable de l'huile de pulpe d'awara, dans un modèle *in vitro* de macrophages murins J774 activés puis *in vivo* dans le choc endotoxique induit par le LPS chez la souris.

II.1 Préparation de la fraction insaponifiable

II.1.1 Solubilisation de l'extrait insaponifiable

L'expérimentation *in vitro* sur culture cellulaire nécessite une solubilisation ou une émulsion en milieu aqueux. Les solvants classiquement utilisés pour tester des molécules hydrophobes sont le DMSO ou l'éthanol ; le tétrahydrofurane (THF) est également utilisé pour solubiliser le β -carotène. Celui-ci est testé à des concentrations allant classiquement de 2,5 à 10 μ M, la solution stock préparée étant à la concentration de 10 mM dans 100 % de THF. Ces différents solvants ont une influence sur la stabilité des composés, en effet l'addition au milieu de culture aqueux entraîne une précipitation des caroténoïdes limitant par la suite l'absorption des molécules par la cellule ainsi que la stabilité des molécules (Tapiero *et al.*, 2004).

Nous avons dans un premier temps testé la solubilisation de l'extrait insaponifiable dans le DMSO et l'éthanol sans résultats concluants. Nous avons donc par la suite testé la solubilisation de l'extrait dans le THF à la concentration de 40 mg/mL qui correspond à une concentration en caroténoïdes totaux comparable à celles utilisées pour le β -carotène seul. L'extrait insaponifiable s'est avéré soluble dans 100 % de THF ; par contre, l'étape de dilution de la solution stock dans le RPMI complet a entraîné une séparation de phase, le THF contenant l'extrait se retrouvant en surface. Nous avons donc opté pour une solubilisation partielle de l'extrait insaponifiable dans

l'éthanol à cette même concentration (40 mg/mL), ce qui nécessite une filtration. La fraction insaponifiable obtenue après filtration est alors diluée dans le RMPI complet, permettant une mise en émulsion de la fraction insaponifiable. Pour une concentration maximale en fraction insaponifiable de 40 $\mu\text{g/mL}$, la concentration finale en éthanol dans le puits est de 0,2 %.

II.1.2 Capacité de piégeage du radical DPPH

La capacité de piégeage à 50 % du radical DPPH (SC_{50}) a été déterminée en milieu éthanolique. La fraction insaponifiable a montré un SC_{50} de $1716,1 \pm 22,9 \mu\text{g/mL}$ et l' α -tocophérol, molécule de référence, a montré un SC_{50} de $20,4 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$. La fraction insaponifiable possède une capacité de piégeage du radical DPPH beaucoup plus importante que l'huile de pulpe d'awara (SC_{50} de 67 mg/mL). La saponification de l'huile nous a donc permis d'obtenir un extrait concentré en molécules antioxydantes.

II.2 Comparaison de la composition chimique de l'extrait et de la fraction insaponifiable

Nous avons détaillé ci-dessous les différences de composition chimique entre l'huile de pulpe, l'extrait et la fraction insaponifiable. En effet, suite à la solubilisation de l'extrait insaponifiable dans l'éthanol puis à sa filtration, des différences de teneurs sont apparues entre l'extrait et la fraction insaponifiable.

II.2.1 Comparaison de la teneur en tocophérols

Les tocophérols ont été dosés par spectrométrie dans l'huile de pulpe, l'extrait insaponifiable ainsi que la fraction insaponifiable (Tableau 8).

Tableau 8 : Comparaison de la teneur en tocophérols de l'huile, de l'extrait et de la fraction insaponifiable

	Tocophérols ($\mu\text{g/mg}$)	Tocophérols ($\mu\text{g/g}$ d'huile)
Huile de pulpe		148 \pm 5,3 ^a
Extrait insaponifiable	5,80 \pm 0,01 ^a	43,5 \pm 0,1 ^b
Fraction insaponifiable	6,75 \pm 0,08 ^a	51 \pm 0,1 ^b

^a : moyenne de 3 déterminations indépendantes \pm sem ; ^b : calculé sur la base du rendement en insaponifiable de 0,75%.

L'extrait insaponifiable a une teneur en tocophérols de $5,8 \mu\text{g}/\text{mg}$ d'extrait insaponifiable, soit de $43,5 \mu\text{g}/\text{g}$ d'huile (valeur calculée sur la base du rendement en insaponifiable de 0,75%). Cette valeur est 3 fois plus faible que la teneur en tocophérols précédemment déterminée directement dans l'huile de pulpe d'awara ($148 \mu\text{g}/\text{g}$ d'huile). Cette différence est liée à la dégradation des tocophérols lors de la phase de saponification qui nécessite de porter à reflux le mélange pendant 1 heure. Il est à noter que seul l'isomère α est détectable dans l'extrait ou la fraction insaponifiable contrairement à l'huile de pulpe qui contient de l' α - et du β -tocophérol. Il n'y a pas de différence de teneur en tocophérols entre l'extrait et la fraction insaponifiable.

II.2.2 Comparaison de la teneur en caroténoïdes

II.2.2.a Dosage des caroténoïdes totaux

Les caroténoïdes totaux ont été dosés par spectrométrie dans l'huile de pulpe, l'extrait insaponifiable ainsi que la fraction insaponifiable (Tableau 9).

Tableau 9 : Comparaison de la teneur en caroténoïdes totaux de l'huile, de l'extrait et de la fraction insaponifiable

	Caroténoïdes totaux (μg d'équivalent β -carotène par mg)	Caroténoïdes totaux (μg d'équivalent β -carotène par g d'huile)
Huile de pulpe		1748 \pm 46 ^a
Extrait insaponifiable	206,7 \pm 2,9 ^a	1550 \pm 22 ^b
Fraction insaponifiable	79 \pm 3,7 ^a	593 \pm 28 ^b

^a : moyenne de 3 déterminations indépendantes \pm sem ; ^b : calculé sur la base du rendement en insaponifiable de 0,75%.

Le dosage des caroténoïdes totaux de l'extrait ($206,7 \mu\text{g}/\text{mg}$) et de la fraction insaponifiable ($79 \mu\text{g}/\text{mg}$) a pu mettre en évidence la différence de teneur en caroténoïdes totaux induite par la solubilisation dans l'éthanol et la filtration. Par le calcul, nous avons également comparé la teneur en caroténoïdes par gramme d'huile. La teneur en caroténoïdes totaux de l'huile de pulpe ($1748 \mu\text{g}/\text{g}$) est plus élevée que dans l'extrait insaponifiable ($1550 \mu\text{g}/\text{g}$), cette différence est probablement due à la dégradation thermique lors de la saponification.

II.2.2.b Structures et dosage par CLHP-DAD des caroténoïdes identifiés

Les structures des différents caroténoïdes identifiés dans l'huile de pulpe, l'extrait et la fraction insaponifiable sont présentés dans la Figure 28. On retrouve des carotènes acycliques

(phytoène, phytofluène, ζ -carotène) qui sont les précurseurs de biosynthèse des caroténoïdes et des carotènes cycliques (α -carotène, β -carotène, γ -carotène, δ -carotène).

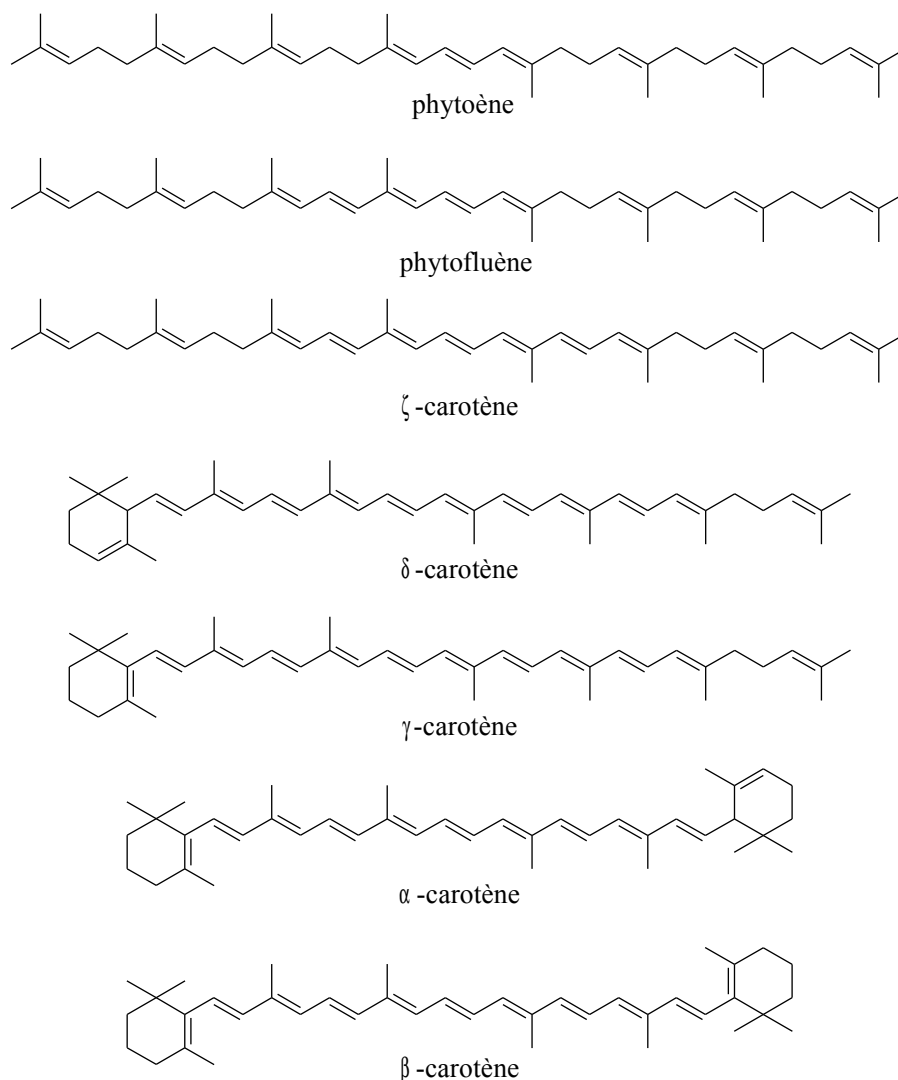


Figure 28 : Structures des différents caroténoïdes identifiés

L'analyse des caroténoïdes par CLHP-DAD a permis d'identifier et de quantifier les caroténoïdes dont les concentrations varient entre l'extrait et la fraction insaponifiable (Tableau 10). On peut donc observer que la diminution importante de la concentration en caroténoïdes totaux dans la fraction insaponifiable est principalement due à la perte de l'isomère *all-trans*- β -carotène ($|\Delta|$ de 99,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Du fait de sa forme *all-trans*, il est moins soluble dans les solvants organiques que ses isomères *cis*, et a de plus tendance à cristalliser ou s'agréger (Britton, 1995).

Tableau 10 : Quantification des caroténoïdes de l'extract et de la fraction insaponifiable obtenus par CLHP-DAD-SM.

Pic	Tr ^a	Tentative d'identification	Extrait insaponifiable ^b	Fraction insaponifiable ^b	Δ ^c
1	27,1	ni	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,0
2	28,0	ni	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,0
3	28,1	phytoène	19,1 ± 2,1	23,4 ± 0,3	4,3
4	29,01	ni	1,4 ± 0,4	0,7 ± 0,1	0,7
5	29,98	cis-phytofluène	8,8 ± 0,9	10,7 ± 0,2	1,9
6	30,15	ni	3,0 ± 0,0	1,3 ± 0,1	1,7
7	30,81	ni	1,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,7
8	31,31	cis-α-carotène	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,0
9	32,2	ni	2,8 ± 0,2	2,7 ± 0,1	0,1
10	32,22	all-trans-phytofluène	1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,0	0,3
11	32,62	15-cis-β-carotène	5,2 ± 0,4	5,2 ± 0,2	0,0
12	32,9-33,2	Mixture	5,5 ± 0,2	3,0 ± 0,1	2,5
13	33,74	13-cis-β-carotène	29,0 ± 1,5	24,6 ± 0,6	4,4
14	34,1	ζ-carotène 1	5,3 ± 0,5	6,3 ± 0,1	1,0
15	34,91	all-trans-α-carotène	5,8 ± 0,5	1,0 ± 0,1	4,8
16	35,04	ni	nc	0,6 ± 0,1	nc
17	37,35	all-trans-β-carotène	106,8 ± 16,3	7,2 ± 0,6	99,6
18	38,15	ζ-carotène 2	13,4 ± 1,4	15,1 ± 0,1	1,7
19	38,6-38,8	mixture (zéacarotène)	10,3 ± 0,5	9,5 ± 0,2	0,8
20	39,5	ζ-carotène 3	3,0 ± 0,3	2,9 ± 0,2	0,1
21	39,6	mixture	3,7 ± 0,2	2,3 ± 0,1	1,4
22	42,2	cis-δ-carotène	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,0
23	43,5	ni	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,1
24	43,89	ni	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,2
25	44,15	all-trans-δ-carotène	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,1
26	48,49	γ-carotène 1	1,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,6
27	49,04	γ-carotène 2	2,8 ± 0,1	2,1 ± 0,2	0,7
Total			233,9 ± 10,3	125,7 ± 2,7	108,2

^a temps de rétention (min), ^b moyenne de 3 déterminations indépendantes ± sem, exprimé en µg d'équivalent β-carotène par mg, ^c valeur absolue de la différence de concentration entre la fraction insaponifiable et l'extract insaponifiable, nc : non calculé, ni : non identifié.

II.2.3 Comparaison de la teneur en phytostérols

II.2.3.a Structures des différents phytostérols identifiés

Les structures des différents phytostérols identifiés dans l'huile de pulpe, l'extract et la fraction insaponifiable sont présentés dans la Figure 29. On retrouve le squalène (précurseur de biosynthèse); deux alcools triterpéniques tétracycliques qui sont le cycloarténol et le 24-méthylèncycloartanol et un alcool triterpénique pentacyclique, le fern-9(11)-en-3β-ol. Un 4-méthylstérol a également été identifié en tant que cycloeucalénol. Les stérols sont quant à eux représentés par l'isofucostérol, le stigmastérol, le campestérol et le β-sitostérol. Un triterpène méthyl éther a également été identifié en tant qu'arundoin, celui-ci correspondant au fern-9(11)-en-3β-ol avec une fonction méthoxy à la place de la fonction alcool.

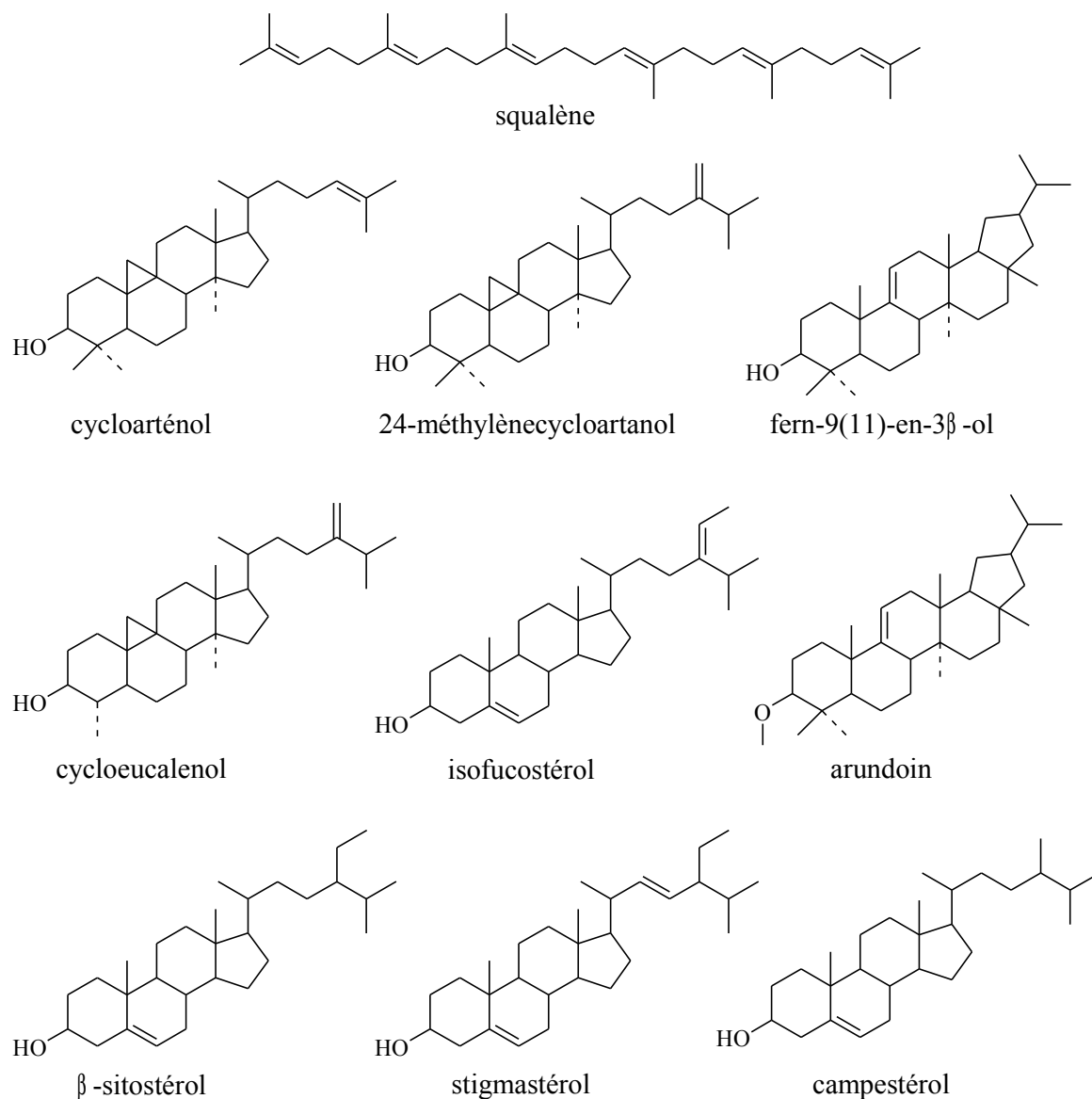


Figure 29 : Structures des différents phytostérols identifiés

II.2.3.b Dosage des phytostérols par CG-SM

L'analyse des phytostérols par CG-SM de l'extrait et de la fraction insaponifiable a montré une différence de teneur en phytostérol totaux de 22,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Tableau 11). Cette différence provient majoritairement de la perte d'arundoin ($|\Delta|$ de 21,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$), cette molécule de par la présence d'une fonction éther à la place de la fonction alcool, a une polarité plus faible que les stérols classiques.

Tableau 11 : Quantification des phytostérols de l'extrait et de la fraction insaponifiable obtenus par CG-SM.

Pic	Tr ^a	Tentative d'identification	Extrait insaponifiable ^b	Fraction insaponifiable ^b	Δ ^c
1	6,3	squalène ¹	6,9 ± 1,2	9,6 ± 0,3	2,7
2	12,9	campestérol ²	15,6 ± 0,7	14,8 ± 0,5	0,8
3	13,7	stigmastérol ²	7,7 ± 0,6	6,7 ± 0,3	1,0
4	14,1	ni	10,1 ± 0,4	10,9 ± 0,6	0,8
5	14,4	ni	5,1 ± 0,5	5,2 ± 0,1	0,1
6	15,2	sitostérol ²	57,0 ± 1,6	56,5 ± 0,9	0,5
7	15,5	isofucostérol ³	5,3 ± 0,4	5,7 ± 0,3	0,4
8	15,8	ni	4,8 ± 0,5	5 ± 0,4	0,2
9	15,9	cycloeucalénol ³	7,4 ± 0,2	7,6 ± 0,4	0,2
10	16,4	arundoin ¹	28,2 ± 1,1	6,8 ± 0,2	21,4
11	16,9	cycloarténol ²	19,8 ± 0,8	16,3 ± 0,1	3,5
12	18,6	24-méthylèncycloartanol ¹	2,4 ± 0,3	3,6 ± 0,6	1,2
13	19,3	fern-9(11)-èn-3-β-ol ³	4,4 ± 0,4	4 ± 0,2	0,4
Total			174,7 ± 6,2	152,6 ± 3,2	22,1

^a Temps de rétention (min), ^b moyenne de trois déterminations indépendantes ± sem, exprimé en µg d'équivalent 5α-cholestane-3β-ol par mg, ^c valeur absolue de la différence de concentration entre la fraction insaponifiable et l'extrait insaponifiable, ¹ 90 % match avec la base de données NIST, ² co-élution avec un standard, ³ tentative d'identification, ni : non identifié.

II.3 Essais préliminaires en culture cellulaire

Afin d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires *in vitro* de la fraction insaponifiable, nous avons dans un premier temps étudié ses effets sur la viabilité cellulaire ainsi que sur la production de médiateurs inflammatoires sur des macrophages J774 non activés. Nous avons également étudié l'effet de la fraction insaponifiable dans deux conditions différentes de traitement afin de déterminer la condition permettant d'obtenir l'effet inhibiteur le plus important sur la production de nitrites induite par l'activation LPS/IFNγ.

II.3.1 Effet de la fraction insaponifiable sur la viabilité cellulaire

Dans un premier temps, nous avons vérifié que le traitement par la fraction insaponifiable n'avait pas d'effet sur la viabilité cellulaire des macrophages J774. Pour cela, nous avons testé la fraction insaponifiable à des concentrations allant de 40 à 5 µg/mL et nous avons également testé l'effet du solvant de la fraction insaponifiable (0,2 % d'éthanol). Nous avons pu vérifier par la méthode du MTS que le solvant n'avait pas d'effet sur la viabilité cellulaire des macrophages J774 (Figure 30). La fraction insaponifiable a montré une augmentation significative mais faible de l'absorbance lue à 490 nm pour les plus fortes concentrations. Ce phénomène pourrait être lié à la coloration de la fraction insaponifiable qui interfère avec le dosage.

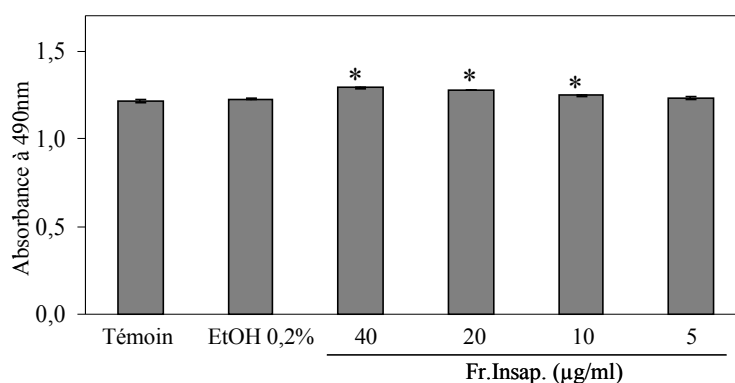


Figure 30 : Effet de la fraction insaponifiable sur la viabilité cellulaire des macrophages J774. Les cellules sont traitées avec la fraction insaponifiable (40, 20, 10, 5 µg/mL) ou par le solvant (EtOH 0,2 %). La viabilité cellulaire est déterminée à 24h par la méthode du MTS. Les résultats sont la moyenne \pm sem ($n=5$) et sont représentatifs de trois expériences indépendantes, * : $p < 0,05$ vs témoin.

II.3.2 Effet de la fraction insaponifiable sur des macrophages J774 non activés

Nous avons recherché si la fraction insaponifiable pouvait induire des médiateurs de l'inflammation sur les macrophages J774 non activés.

Le NO est un médiateur impliqué dans les processus inflammatoires et est rapidement dégradé en nitrites qui peuvent être dosés par la méthode colorimétrique de Griess. Le traitement des macrophages J774 non activés par la fraction insaponifiable entraîne une augmentation du taux de nitrites à 24h, cependant cet effet diminue à 48h (Figure 31). Il semble que la coloration de la fraction insaponifiable interfère avec le dosage des nitrites puisque le taux de nitrites mesurés diminue de 24 à 48h et que la fraction insaponifiable perd simultanément sa coloration.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons évalué l'interférence de la fraction insaponifiable sur la gamme étalon. Nous avons donc comparé une gamme étalon réalisée dans du RMPI complet et une gamme étalon dans du RPMI complet contenant 40 µg/mL de fraction insaponifiable. Nous avons pu mettre en évidence une sur-évaluation de la concentration en nitrites par la fraction insaponifiable ; cette interférence est probablement due à la forte coloration et/ou à la présence de nitrites dans la fraction insaponifiable. Nous avons donc par la suite soustrait l'effet de la coloration sur la production de nitrites induite par le LPS/IFN γ .

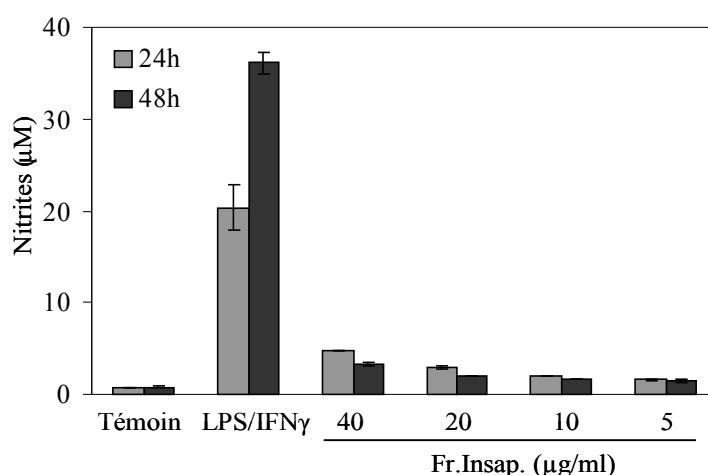


Figure 31 : Effet de la fraction insaponifiable sur la production de nitrites sur des macrophages J774 non activés. Les cellules sont traitées avec la fraction insaponifiable (40, 20, 10, 5 $\mu\text{g/mL}$) ou activées par la combinaison LPS (1 ng/mL) + IFN γ (10 UI/mL). La production de nitrites est déterminée par le réactif de Griess dans les surnageants de culture. Les résultats sont la moyenne \pm sem ($n=3$) et sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Nous avons également recherché si la fraction insaponifiable n'induisait pas de production de PGE $_2$, TNF α , IL-6 et IL-10 sur des macrophages J774 non activés. La technique ELISA permettant de s'affranchir du problème de coloration de la fraction insaponifiable, nous avons pu vérifier sans ambiguïté que la fraction insaponifiable n'induisait pas la production de ces médiateurs inflammatoires sur des macrophages J774 non activés (valeurs inférieures au seuil de détection).

II.3.3 Détermination des conditions de prétraitement en culture cellulaire

Le choix d'un prétraitement de 4h avec la fraction insaponifiable a été déterminé après l'étude de deux conditions expérimentales. Nous avons choisi le dosage des nitrites qui est un dosage rapide et peu coûteux pour caractériser ces deux conditions expérimentales.

Nous avons donc testé l'effet de la fraction insaponifiable sur la production de nitrites induite par le LPS/IFN γ en traitant simultanément les cellules avec la fraction insaponifiable ou en prétraitant les cellules 4h avant l'activation au LPS/IFN γ . L'effet de ces deux conditions expérimentales a été suivi à 24 et 48h après l'activation des cellules (Figure 32).

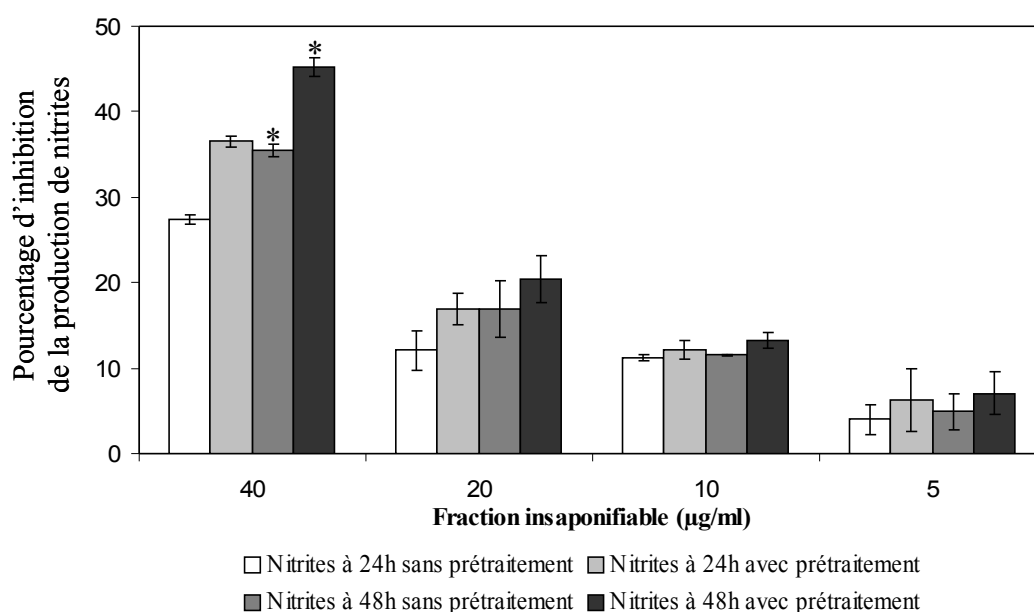


Figure 32 : Effet de la fraction insaponifiable avec ou sans prétraitement de 4h sur la production de nitrites à 24 et 48h sur des macrophages J774 activés au LPS/IFN γ .

Les cellules ont été traitées avec la fraction insaponifiable (40, 20, 10, 5 µg/mL) et activées par la combinaison LPS (1 ng/mL) + IFN γ (10 UI/mL). La production de nitrites est déterminée par le réactif de Griess dans les surnageants de culture. Les résultats sont la moyenne \pm sem (n=3) et sont représentatifs de deux expériences indépendantes ; * : $p < 0,05$ vs sans pré-traitement.

Cette étude montre que le prétraitement de 4h permet d'augmenter significativement le pourcentage d'inhibition de 10 % par rapport à la condition sans prétraitement pour la concentration de 40 µg/mL, et que cette différence est visible dès 24h après l'activation. Suite à ces résultats, nous avons donc choisi comme conditions expérimentales, de prétraiter les cellules par la fraction insaponifiable pendant 4h avant l'activation cellulaire par le LPS/IFN γ .

II.4 Publication n°2

L'analyse de la composition en différents constituants de la fraction insaponifiable d'huile de pulpe d'awara ainsi que l'évaluation de ses propriétés anti-inflammatoires dans un modèle de macrophage activé *in vitro* et un modèle de choc endotoxique *in vivo* vont faire l'objet d'une seconde publication.

Nous avons, dans un premier temps, caractérisé la fraction insaponifiable d'huile de pulpe d'awara pour ces différents constituants. Les compositions en caroténoïdes, tocophérols et phytostérols ont notamment été étudiées.

Dans une deuxième partie, les propriétés anti-inflammatoires de la fraction insaponifiable ont été étudiées. La capacité de la fraction insaponifiable à inhiber l'activité des cyclo-oxygénases a été étudiée dans un modèle *in vitro*. Suite à des résultats concluants, nous avons étudié l'effet de la fraction insaponifiable dans un modèle de macrophages J774 activés, sur la production de nitrites, de PGE₂, et de différentes cytokines. De même, l'effet sur l'expression des enzymes impliquées dans la production de nitrites et de PGE₂ (iNOS et COX-2) a été recherché. Ce travail a été poursuivi dans un modèle *in vivo* de choc endotoxique chez la souris. La production de cytokines pro- et anti-inflammatoires (TNF α , IL-6 et IL-10) dans le sérum et dans différents organes a été évaluée afin de confirmer les effets observés *in vitro*.

PUBLICATION N°2

Chemical composition and anti-inflammatory properties of an unsaponifiable fraction from awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil in activated J774 macrophages and in a mice model of endotoxic shock

Emilie Bony, Emilie Dussossoy, Karine Portet, Pierre Brat, Jean Giaimis, Alain Michel, Frédéric Boudard

Chemical composition and anti-inflammatory properties of an unsaponifiable fraction from awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil in activated J774 macrophages and in a mice model of endotoxic shock

Emilie Bony, Emilie Dussossoy, Karine Portet, Pierre Brat, Jean Giaimis, Alain Michel, Frédéric Boudard

ABSTRACT

Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil has been shown to possess anti-inflammatory properties *in vivo*, and contains an unsaponifiable matter rich in bioactive compounds. This study focused on ethanolic unsaponifiable fraction (EUF) of awara pulp oil that we have characterized for its chemical composition. Carotenoid, phytosterol, and tocopherol content represent 125.7, 152.6, and 6.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of EUF respectively. We further evaluated this fraction for anti-inflammatory properties in J774 macrophages stimulated by lipopolysaccharide plus interferon γ . EUF strongly suppressed nitric oxide (NO), prostaglandin E_2 , Tumor Necrosis Factor α ($\text{TNF}\alpha$), and interleukin (IL) -6 and -10 productions. Moreover, it inhibited expression of inducible NO synthase and cyclooxygenases-2 *in vitro*. Anti-inflammatory properties of EUF were also confirmed *in vivo* by modulation of $\text{TNF}\alpha$, IL-6 and IL-10 production in LPS-induced endotoxic shock in mice and appeared to be related to inhibition of inflammatory cell activation.

KEYWORDS

Awara (*Astrocaryum vulgare* M.), unsaponifiable fraction, carotenoids, phytosterols, tocopherols, anti-inflammatory, J774 macrophages, endotoxic shock, iNOS, COX-2, $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-10.

INTRODUCTION

Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) belongs to the Arecaceae family and is principally used in nutrition because of its high carotenoid content of pulp oil (1). Moreover, therapeutic uses are given in the traditional pharmacopoeia of French Guiana for skin and eye diseases (2). In our previous study, we demonstrated that awara pulp oil exhibit anti-inflammatory properties *in vivo* both in acute and chronic inflammation models (3). We hypothesized that anti-inflammatory properties of awara pulp oil is mainly or partly due to the unsaponifiable matter that represents almost 1% of the total lipid fraction. The unsaponifiable is a potential source of bioactive molecules such as phytosterols, carotenoids, or tocopherols; compounds that are partly responsible for biological properties of vegetable oils (4). Indeed, anti-inflammatory properties of olive oil have been attributed in part to minor compounds such as tyrosol, squalene or β -sitosterol (5, 6). Palm oil also possesses beneficial effects due to its high carotenoid and tocotrienol contents (7). We therefore decided to study specifically the unsaponifiable fraction of awara pulp oil in order to explain its anti-inflammatory properties.

Many human diseases such as septic shock, rheumatoid arthritis, asthma, or cancer are associated with acute or chronic inflammation (8-10) and with overproduction of reactive oxygen species leading to imbalance between oxidative stress and antioxidant defenses (11). Inflammation is a complex biological response which is regulated by a large number of inflammatory mediators released from cells such as macrophages, lymphocytes, leukocytes, and mast cells (12). They included arachidonic acid metabolites, reactive oxygen species, nitric oxide, and cytokines such as interleukin (IL-6 or 10) and tumor necrosis factor α (TNF α). Nitric oxide (NO) is a reactive radical molecule playing an important role in physiologic conditions however an excessive production of NO can result in inflammatory reactions. Indeed, three isoforms of nitric oxide synthases (NOS) have been found and it is the inducible NOS (iNOS) which is implicated in inflammatory response (13). Cyclo-oxygenases (COX) are enzymes responsables for production of important biological mediators called prostanoids (including prostaglandins (PG), prostacyclin, and thromboxanes). Two isoforms of COX have been found: COX-1 which is constitutive and COX-2 which is induced during inflammation and responsible for the production of large amounts of pro-inflammatory prostaglandins such as PGE₂ regulating vascular permeability, platelet aggregation, and thrombus formation at the inflammation site (14, 15). Therefore, the discovery of plant extracts that can down-regulate the expression or activity of

iNOS and COX-2 and also cytokine productions may lead to identification of potent anti-inflammatory compounds.

In the present study, we first investigated the ethanolic unsaponifiable fraction (EUF) of awara pulp oil for carotenoid, tocopherol, and phytosterol content. Then, we evaluated the *in vitro* inhibitory effects of EUF on NO, PGE₂, IL-6, TNF α , and IL-10 productions induced by LPS/IFN γ in J774 macrophages. We also determined the effects of the EUF on iNOS and COX-2 expression. To confirm potential anti-inflammatory effects of EUF *in vitro*, we therefore evaluated whether EUF also inhibit IL-6, TNF α , and IL-10 productions in an endotoxic shock model in mice.

MATERIELS AND METHODS

Plant Material. Awara fruits (*Astrocaryum vulgare*) were obtained from CIRAD French Guiana (Combi station, Sinnamary, March 2008) and were stored at -20 °C until analysis to avoid enzymatic degradation.

Chemicals. All solvents were HPLC or analytical grade, purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France) except methyl tert-butyl ether (MTBE) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). H₂PO₄, KOH, BSA, LPS (*E.coli*, 055: B5), Tris HCl, NaCl, Triton X100, DTT, EDTA, EGTA, PMSF, indomethacin, fluorescein, 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethyl-2-carboxylic acid (Trolox), trypan blue, β -mercaptoethanol, bromophenol blue, sulfanilamide, naphthylethylenediamide, stigmasterol, campesterol, β -sitosterol, fucosterol, and 5 α -cholestane-3 β -ol were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). 2-2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was purchased from Wako Chemicals (Richmond, USA). RPMI 1640 with glutamax[®], foetal bovine serum, streptomycin, and penicillin were purchased from Gibco, Invitrogen, (Cergy Pontoise, France). Recombinant murine IFN γ was purchased from Genzyme (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). Anhydrous sodium sulphate and potassium hydroxide were purchased from Carlo Erba. Tocopherols standard were from VWR International SAS (Fontenay sous Bois, France). Cycloartenol and β -carotene were from Extrasynthese (Genay, France). Tween 20, glycerol and SDS were from Euromedex (Souffelweyersheim, France).

Sample Preparation. Pulp fruit was manually removed from the seeds, and ball milled with liquid nitrogen for Soxhlet extraction of oil with hexane (4 h). After drying with anhydrous sodium sulfate, the solvent was removed by vacuum distillation at 30 °C to obtain the crude oil,

stored at -20 °C under nitrogen. Unsaponifiable extract was obtained by saponification of this oil pulp. Briefly, 10 g of awara pulp oil was saponified by refluxing with 50 mL of methanolic solution of KOH 2 M for 1 h. After cooling at room temperature, 100 mL of water were added. The aqueous phase was washed three times with 50 mL of hexane, and the hexanic fractions were collected, washed three times with 50 mL of water and dried with sodium sulphate anhydrous, filtered, and then evaporated to dryness using a rotary evaporator at reduced pressure. The resulting unsaponifiable extract was stored at -20 °C under nitrogen. The chemical and biological analyses were performed on the ethanolic unsaponifiable fraction (EUF) prepared by dissolving 20 mg of the unsaponifiable extract in 500 μ L of ethanol and filtered on a 0.45 μ m filter.

Tocopherol Identification and Quantification. Quantification of tocopherols present in EUF was achieved in accordance with AFNOR (Association Française de Normalisation) Method (16), by normal-phase HPLC with fluorometric detection (excitation: 290, emission: 330 nm) with an ACE 5 SIL column (4.6 \times 250 mm, 5 μ m, Advanced Chromatography Technologies®, Aberdeen, Scotland, UK). The HPLC consists of modules provided by Thermo-Finnigan (France): a quaternary pump (P1000XR), a sample passor (AS1000), and a valve of injection to 6 ways provided with a loop of 20 μ L, a spectrofluorimetric detector (FL3000) and software for data processing (PC 100). The elution was performed with a mobile phase: hexane/dioxane 97/3 (v/v) at a flow rate of 1 mL/min. The determination was carried out with a standard curve of authentic tocopherols. Analyses were done in triplicate independent measurements and results were expressed as μ g of tocopherols per mg of EUF \pm sem.

Phytosterol Identification and Quantification. GC-MS analysis was performed on an Agilent 6890 GC fitted with a DB1 column (0.25 mm \times 30 m, 0.25 mm, J&W Scientific, Folsom, CA, USA), equipped with an Agilent 5973N mass selective detector that allowed the direct analysis of sterols without derivatisation. The injector was set to 290 °C and injection volume was 1 μ L. The carrier gas was helium at a flow rate of 1 mL/min and the temperature settings were as follows: 5 min at 250 °C, from 250 °C to 270 °C at 1 °C/min, from 270 °C to 290 °C at 10 °C/min. The mass spectrometer was operated in the electron impact ionization mode (70 eV), the source temperature was programmed from 250 °C, and the range mass of acquisition was 50-450 Da. The identifications of the components were based on the comparison of their mass spectra with those of Wiley and NIST (National Institute of Standards and Technology) library and literature data, as well as by comparison of their retention indices with co-injections of standards. For quantification, 5 α -cholestane-3 β -ol was added to EUF before the injection (0.5 mg

for 5 mg of EUF). Analyses were done in triplicate independent measurements and results were expressed as μg of 5α -cholestane- 3β -ol equivalent per mg of EUF \pm sem.

Carotenoid Identification and Quantification. The HPLC apparatus was a Surveyor plus model equipped of an autosampler, a PDA detector, and LC pumps (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA). Carotenoids were separated along a C30 column (4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$), YMC (EUROP, GmbH, Dinslaken, Germany). The mobile phases were water as eluent A, methanol as eluent B, and MTBE as eluent C. Flow rate was fixed at 1 mL/min and the column temperature was set at 25°C . A gradient program was performed: 0 min, (40/60/0) (% A/B/C); 0-5 min, (20/80/0); 5-10 min, (4/81/15); 10-60 min, (4/11/85); 60-71 min, (0/100/0); 71-72 min, back to the initial conditions for reequilibration. The injection volume was $20 \mu\text{L}$ and the detection was carried out between 250 and 600 nm. After passing through the flow cell of the diode array detector the column eluate was split and 0.5 mL was directed to the ion trap mass. Experiments were performed in APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) positive ion mode, with total ion current scanning range 100-1500 m/z , corona current $5 \mu\text{A}$, source temperature, 450°C , capillary temperature, 350°C , capillary voltage, 10 V and N_2 as dry gas at 80 mL/min. Carotenoids identification was done based on retention times, absorption spectra, % III/II, mass spectra, and comparison with literature data (17-19). Carotenoids were quantified by HPLC using an Agilent 1100 System (Massy, France). The column and gradient conditions were the same as used in mass spectrometry analysis. The injection volume was $20 \mu\text{L}$. Absorbance was followed at 290, 350, 400, and 450 nm using an Agilent 1100 photodiode array detector. Chromatographic data and UV-visible spectra were collected, stored, and integrated using an Agilent Chemstation plus software. A standard curve was obtained with β -carotene standard to determine the total amount of carotenoids. The concentration of β -carotene solutions was calculated by spectrophotometric measurement at 450 nm dissolving standard with the appropriate solvent and using a molar extinction coefficient (ϵ) (17). Quantification of phytoene, phytofluene and ζ -carotene isomers was done at their maximum absorption wavelength (290, 350, and 400 nm respectively) and expressed as β -carotene equivalent at 450 nm. Analyses were done in triplicate independent measurements and results were expressed as μg of β -carotene equivalent per mg of EUF \pm sem.

COX Inhibitory Assay Kit. The ability of EUF and indomethacin to inhibit *in vitro* ovine COX-1 and COX-2 was determined using an enzyme immuno assay kit: COX (ovine) Inhibitor Screening Assay[®] (Cayman Chemical, Spi Bio, Montigny-le-Bretonneux, France) that measures

prostaglandins $F_2\alpha$ by SnCl_2 reduction of COX-derived prostaglandins FH_2 produced in the COX reaction. Briefly, tested compounds were incubated with COX-1 or COX-2 enzyme in buffer in the presence of heme at 37 °C. The substrate of COXs: arachidonic acid was then added and the level of prostaglandins $F_2\alpha$ was dosed. In the presence of COX inhibitors, the level of prostaglandins $F_2\alpha$ decreased.

NO scavenging activity. NO scavenging activity was measured by evaluation of nitrite production after photochemical degradation of sodium nitroprusside (SNP) (20). Briefly, 50 μL of SNP (2.5 μM) were incubate with 50 μL of EUF (5-40 $\mu\text{g/mL}$) during 1 h under daylight lamp to allow photodegradation of SNP. Nitrite production was then measured by Griess reaction. Data presented correspond to the mean \pm sem (n=3) of three independent determinations.

Macrophage Culture. The J774 macrophage cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, TIB67; Rockville, MD). Cells were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C and cultured in RPMI 1640 Glutamax[®] medium containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, supplemented with streptomycin (20 $\mu\text{g/mL}$) and penicillin (100 Units/mL) (Complete RPMI 1640 medium). Cells were grown to confluence in sterile tissue culture flasks and gently detached by scraping. Cell number and viability were assessed microscopically using trypan blue exclusion test.

Cell Viability. Cell respiration, an indicator of cell viability, was assessed by CellTiter 96 Aqueous non radioactive cell proliferation assay (Promega France, Charbonnières, France), using MTS inner salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) and an electron-coupling reagent: phenazine methosulphate (PMS). Briefly, 10^5 cells (100 μL /well) were incubated in complete RPMI 1640 medium in a 96-well plate at 37 °C for adherence. After 1 h, the cells were treated with different unsaponifiable extract concentrations ranging from 5 to 40 $\mu\text{g/mL}$ in final volume of 200 μL . 20 h later, 20 μL of MTS/PMS were added to each well. The plate was incubated at 37 °C for another 4 h and the absorbance was read at 490 nm. Absorbance was proportional to mitochondrial respiration, and therefore to cell viability. The percentage of viable cells was calculated as follows: $\% \text{ viability} = \text{absorbance of sample} / \text{absorbance of control} \times 100$.

Cell Treatments. The cells (5×10^5 cells/well) were seeded onto a 24-well culture plate for 1 h in complete RPMI 1640 medium and treated with various concentrations of EUF (5-40 $\mu\text{g/mL}$). After 4 h incubation at 37 °C, cells were stimulated with LPS/IFN γ

(1 ng/mL + 10 U/mL). The supernatants were collected at 6, 24 and 48 h for mediators measurements (stored at -20 °C until use). For western-blotting, cells were seeded onto a 6-well culture plate at 15×10^5 cells/well in complete RPMI 1640 medium.

Quantification of nitrite Production. Nitrite concentration in the cultured medium was determined via the Griess reaction as described by Boudard *et al.* (21). Briefly, 100 μ L of 48 h supernatant from each well was mixed with 100 μ L of Griess reagent (0.1% naphthylethylenediamide dihydrochloride in H₂O and 1% sulfanilamide in 5% concentrated H₂PO₄; v/v 1/1) in a 96-well plate. After an incubation of 10 min at room temperature in the dark, the optical density was determined at 550 nm using a microplate reader (Molecular Devices). Nitrite concentration was calculated from a sodium nitrite standard curve (0-100 μ M). EUF did not induce nitrite production in unstimulated macrophages (data not shown).

PGE₂ and Cytokine Measurements. Prostaglandins E₂ (PGE₂) concentrations of cell culture supernatants from 24 h were measured using an EIA kit (Cayman, Spi Bio, Montigny-le-Bretonneux, France). Levels of cytokine (TNF α , IL-6, and IL-10) were measured in supernatants of cell culture, tissues homogenates and in serum by using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (eBioscience, Clinisciences, Montrouge, France) following the manufacturers instructions. Detection limits were 4, 4, and 2 pg/ml for TNF α , IL-6, and IL-10 respectively. EUF did not induce PGE₂, TNF α , IL-6, and IL-10 production in unstimulated macrophages (data not shown).

Western-Blot Analysis. Cells were placed on ice and resuspended in cold lysis buffer (phosphate-buffered saline 1% Triton X100 and inhibitor protease cocktail, Roche). After incubation on ice for 30 min, cells were scrapped and lysates were centrifuged at 13 000 g for 2 min. The supernatants were collected and boiled for 10 min in mix buffer (125 mM Tris, 10% glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 0.5% blue bromophenol) and stored at -20 °C until analysed. Proteins were separated on an 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinyl difluoride membranes (PVDF, Immobilon-P, Millipore). Membranes were then blocked with 5% fat-free dry milk in TBST-T pH 7.5 (Tris-buffered saline [10 mM Tris, 0.5 M NaCl] with 0.05% Tween 20) for 30 min, and then incubated 1 h at room temperature with rabbit polyclonal anti-iNOS antibody (M-19) or anti-COX-2 antibody (M-19) diluted to 1:1 000 and with monoclonal anti- β -actin (C4) diluted to 1:5 000 (Santa Cruz Biotechnology, CliniSciences, Montrouge, France). The membranes were then incubated with anti-rabbit IgG

peroxydase conjugated (1/10 000, Jackson ImmunoResearch, Interchim, Montluçon, France), and bands were detected by enhanced chemiluminescence detection (ECL, Amersham, GE Healthcare, Orsay France). Signal intensities were evaluated by densitometric analysis (ImageJ software, NIH, USA) and normalized with β -actine. EUF did not induce COX-2 and iNOS expression in unstimulated macrophages (data not shown).

Endotoxic shock model. Animals were obtained from Janvier[®] (France) and were kept at an ambient temperature of 22 ± 2 °C under a 12 h normal phase light-dark cycle. Food and water were provided ad libitum, and mice were acclimated for 1 week prior to the start of the experiment. Six-week-old male Balb/c mice were randomly assigned to five groups of 8 mice. Control group was IP injected with saline. LPS 1.5 h and LPS 6 h groups were IP injected with LPS at 20 mg/Kg. EUF 1.5 h and EUF 6 h groups were pre-treated by IP with EUF (25 mg/Kg) 2 h before LPS injection. Rats were anesthetized and blood was collected by cardiac puncture 1.5 h or 6 h after LPS injection, and were kept 30 min at room temperature for clotting and centrifuged at 3 000 g during 20 min at 4 °C. Serum was stored at -20 °C until cytokine analysis. The following tissues were quickly removed and snap-frozen: liver, spleen, kidney and lung. Tissues were homogenized in cold buffer lysis (10 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF) and centrifuged at 4 °C during 10 min at 15 000 g. Supernatants were stored at -20 °C until cytokine analysis. Proteins were dosed in supernatants of homogenized tissue by Bradford method. Quantification of proteins was achieved with a standard curve of BSA (1.4 to 0.25 mg/mL). ORAC assays were performed as previously described by Dussossoy *et al.* (22). The ORAC values were expressed as micromole Trolox equivalents per mL of serum.

Statistical Analysis. Data were analyzed using unpaired Student's t-test, and results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Animal Care and Use. These experiments were carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the US National Institutes of Health. Our laboratory practice was approved by the « Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale Languedoc-Roussillon »

RESULTS

Phytochemical Analysis. We first measured the content of tocopherols, phytosterols, and carotenoids in EUF. The HPLC-FID analyse only revealed the presence of α -tocopherol in EUF with a content of $6.75 \mu\text{g} \pm 0.08$ per mg of EUF (mean of 3 independent determinations \pm sem).

EUF was injected in HPLC-DAD and HPLC-MS for tentative identification and quantification of carotenoids (Table 1). The different isoforms of phytoene, phytofluene, α , β , δ , γ , and ζ -carotene detected in EUF, have already been identified in awara pulp oil (3). Quantification of phytoene, phytofluene and ζ -carotene isomers was done at their maximum absorption wavelength (290, 350, and 400 nm respectively) and expressed as β -carotene equivalent at 450 nm. The principal carotenoids present are β -carotene isomers and 13-*cis*- β -carotene represents almost 20% of the total carotenoid content followed by *all-trans*- β -carotene (6%) and 15 *cis*- β -carotene (4%). Phytoene and phytofluene isomers represent almost 19% and 10% of the total carotenoid content respectively. The total amount of carotenoids was $125.7 \pm 2.7 \mu\text{g}$ of β -carotene equivalent/mg of EUF.

Table 1: Carotenoid identification and quantification of EUF determined by HPLC-DAD-MS.

N° Peak	RT ^a (min)		λmax (nm)			% III/II	% A _B /II	[M+H] ⁺ (m/z)	Tentative identification	Content ^b (μg/mg)
		cis	peak I	peak II	peak III					
1	27.1	330	406	436	468	nc	nc	nd	ni	0.5 ± 0.0
2	28.0		406	430	469	nc	0	nd.	ni	0.4 ± 0.1
3	28.1		276	286	299	0	0	545	phytoene	23.4 ± 0.3
4	29.0		414	438	476	11	0	nd	ni	0.7 ± 0.1
5	30.0	331	332	348	367	64	0	543	cis-phytofluene	10.7 ± 0.2
6	30.2		422	446	472	17	0	553	ni	1.3 ± 0.1
7	30.8		420	440	466	nc	nc	nd	ni	0.4 ± 0.1
8	31.3		416	438	466	8	27	537	cis-α-carotene	0.9 ± 0.0
9	32.2	332	414	438	462	nc	0	nd	ni	2.7 ± 0.1
10	32.2		332	348	368	108	0	543	all-trans-phytofluene	1.6 ± 0.0
11	32.6		421	448	472	nc	52	537	15-cis-β-carotene	5.2 ± 0.2
12	32.9-33.2		nd	nd	nd			537	Mixture	3.0 ± 0.1
13	33.7	338	421	444	468	nc	46	537	13-cis-β-carotene	24.6 ± 0.6
14	34.1		379	400	424	109	0	541	ζ-carotene 1	6.3 ± 0.1
15	34.9		422	446	474	52	0	537	all-trans-α-carotene	1.0 ± 0.1
16	35.0		420	442	470	nc	0	537	ni	0.6 ± 0.1
17	37.4	337	422	450	478	17	0	537	all-trans-β-carotene	7.2 ± 0.6
18	38.1		379	400	424	114	0	541	ζ-carotene 2	15.1 ± 0.1
19	38.6-38.8		nd	nd	nd			539/537	mixture (zeacarotene)	9.5 ± 0.2
20	39.5		380	400	426	nc	0	541	ζ-carotene 3	2.9 ± 0.2
21	39.6	350	nd	nd	nd			537	mixture	2.3 ± 0.1
22	42.2		432	454	482	nc	47	537	cis-δ-carotene	0.2 ± 0.1
23	43.5		410	434	460	92	0	nd	ni	0.5 ± 0.1
24	43.9		411	438	462	nc	0	nd	ni	0.8 ± 0.1
25	44.2	335	432	458	484	nc	0	537	all-trans-δ-carotene	0.6 ± 0.1
26	48.5		438	461	490	30	0	537	γ-carotene 1	1.3 ± 0.1
27	49.0		436	462	491	29	0	537	γ-carotene 2	2.1 ± 0.2
Total carotenoids									125.7 ± 2.7	

a: Retention time; *b*: Mean of three independent determinations \pm sem, expressed as μg of β -carotene equivalent/mg of EUF; nc: not calculated; nd: not detected; ni: not identified.

GC-MS analyses allowed identification and quantification of phytosterols in EUF (Table 2) which have already been detected in awara pulp oil (3). The total content of phytosterols was $152.6 \pm 3.2 \mu\text{g}$ of 5α -cholestane- 3β -ol equivalent/mg of EUF and β -sitosterol represents almost 37% of the phytosterols.

Table 2: Phytosterol identification and quantification of EUF determined by GC-MS.

N° peak	RT ^a (min)	Tentative identification	Content ($\mu\text{g}/\text{mg}$) ^b
1	6.3	Squalene ^c	9.6 \pm 0.3
2	12.9	Campesterol ^d	14.8 \pm 0.5
3	13.7	Stigmasterol ^d	6.7 \pm 0.3
4	14.1	ni	10.9 \pm 0.6
5	14.4	ni	5.2 \pm 0.1
6	15.2	β -sitosterol ^d	56.5 \pm 0.9
7	15.5	Isofucosterol ^e	5.7 \pm 0.3
8	15.8	ni	5.0 \pm 0.4
9	15.9	Cycloeucalenol ^e	7.6 \pm 0.4
10	16.4	Arundoin ^c	6.8 \pm 0.2
11	16.9	Cycloartenol ^d	16.3 \pm 0.1
12	18.6	24-methylenecycloartanol ^c	3.6 \pm 0.6
13	19.3	fern-9(11)-en-3 β -ol ^e	4.0 \pm 0.2
Total phytosterol			152.6 \pm 3.2

a: Retention time; *b*: Mean of three independent determinations \pm sem, expressed as μg of 5 α -cholestane-3 β -ol equivalent/mg of EUF; *c*: 90% match with NIST database; *d*: standard co-elution; *e*: tentative identification; ni: not identified.

Effect of EUF on COX-1 and COX-2 activities. We evaluated the capacity of EUF to inhibit COX-1 and COX-2 activities by an *in vitro* test, and compared it to indomethacin (NSAIDs of reference). As shown in Figure 1, EUF induced a strong and dose-dependent inhibition. At 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, EUF can decrease COX-1 and COX-2 activities by 41% and 72% respectively. In comparison, indomethacin (10 μM for COX-1 and 0.5 μM for COX-2) decreased COX-1 and COX-2 activities by 42% and 56% respectively.

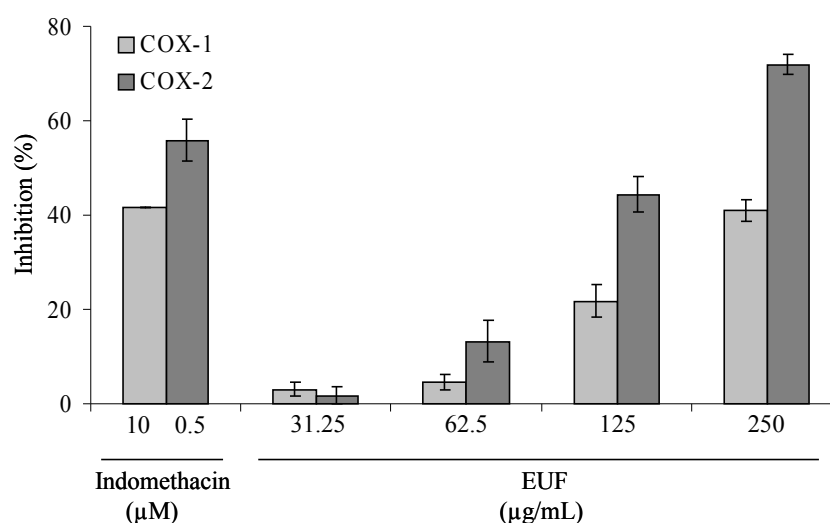


Figure 1: In vitro effect of EUF and indomethacin on COX-1 and COX-2 activities.

Values are mean \pm sem ($n=3$) using a COX inhibitor kit. The results are representative of two independent experiments.

NO Scavenging activity. We evaluated the NO scavenging activity of EUF on photodegradation of SNP. EUF showed a significant scavenging activity on NO production from 40 $\mu\text{g/mL}$ ($23.6 \pm 1.5\%$ inhibition) to 10 $\mu\text{g/mL}$ ($7.0 \pm 2.5\%$ inhibition) (mean \pm sem, $n=3$).

Cell viability. We measured the cell toxicity of EUF by MTS/PMS assay. The results showed that EUF was not toxic up to 40 $\mu\text{g/mL}$. This concentration of 40 $\mu\text{g/mL}$ corresponds to a 0.2% ethanol vehicle and was also test on MTS assay, and did not show any toxic effect. Cell viability showed that the observed effects are not due to cell death by EUF or by the vehicle (data not shown).

Effect of EUF on nitrite production and iNOS expression by LPS/IFN γ -activated J774 macrophages. Nitric oxide is an important pro-inflammatory mediator produced during inflammation by the inducible enzyme iNOS. NO production was assessed by measuring the accumulation of nitrites, a stable metabolite of NO, by colorimetric assay based on the Griess reaction, in the culture supernatant of 48 h. Compared to unstimulated macrophages, activation by LPS/IFN γ increased dramatically nitrite production (Figure 2A). Treatment with EUF induced an inhibition of nitrite production and this effect was dose dependent with a 47% inhibition at 40 $\mu\text{g/mL}$. To further elucidate the effects of EUF, we examined by Western-blot analysis the protein expression of iNOS (Figure 2B) in LPS/IFN γ -activated J774 macrophages. EUF inhibit iNOS expression in a dose-dependent manner with a 79% inhibition at 40 $\mu\text{g/mL}$. Thus, the

decrease in nitrite concentrations of supernatants induced by EUF is mediated by direct NO scavenging activity and inhibition of iNOS protein expression in LPS/IFN γ -activated J774 macrophages.

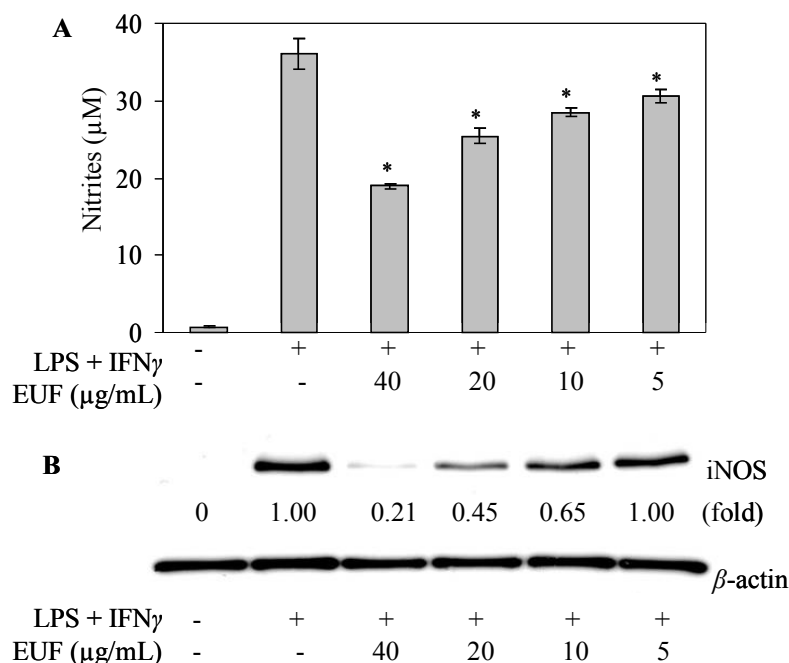


Figure 2: Effect of EUF on nitrites production and iNOS expression by LPS/IFN γ -activated J774 macrophages.

Cells were pretreated with EUF (40, 20, 10, 5 μ g/mL) for 4 h and then activated with LPS (1 ng/mL) + IFN γ (10 UI/mL). (A) Nitrites were measured by Griess reagent 48 h after LPS/IFN γ activation in supernatants. Values are mean \pm sem ($n=3$). *: $p < 0.05$ vs LPS/IFN γ activation. The results are representative of three independent experiments. (B) iNOS expression was determined by western-blotting 24 h after LPS/IFN γ activation. Signal intensities were evaluated by densitometric analysis (ImageJ software, NIH, USA) and normalized with β -actine. The data is a representative profile of three independent experiments.

Effect of EUF on PGE₂ production and COX-2 expression by LPS/IFN γ -activated J774 macrophages. PGE₂, the most important pro-inflammatory product of COX-2, was quantified in 24 h culture supernatant using EIA. Compared to unstimulated macrophages, activation by LPS/IFN γ dramatically increased the PGE₂ production. EUF induced a dose dependent inhibition of the PGE₂ production, with a 55% inhibition at 40 μ g/mL (Figure 3A). Then, we examined the inhibitory effect on COX-2 expression (Figure 3B) in LPS/IFN γ -activated J774 macrophages, by a Western-blot analysis. EUF inhibit COX-2 expression in a dose-dependent manner; it has shown a 55% inhibition at the dose of 40 μ g/mL. Thus, decrease in PGE₂ production induced by EUF is due to inhibition of both expression and activity of COX-2.

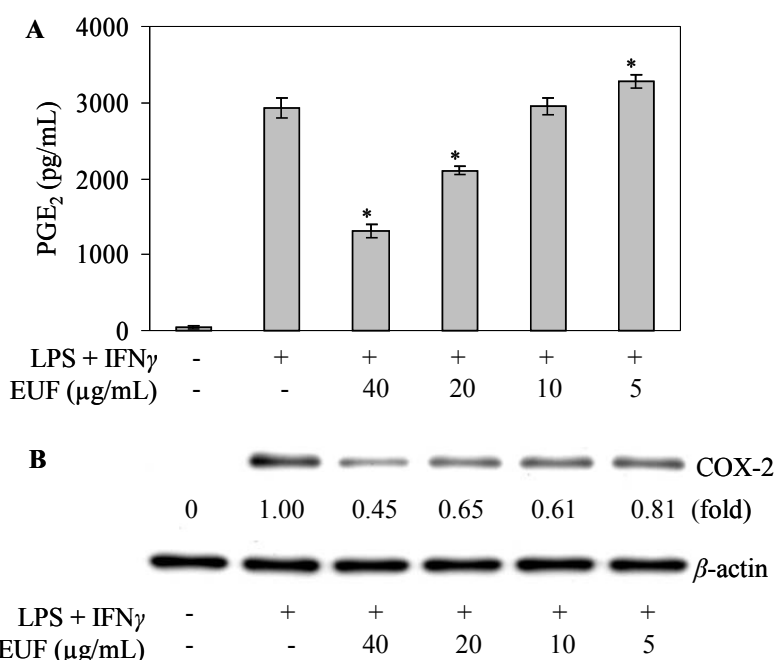


Figure 3: Effect of EUF on PGE₂ production and COX-2 expression by LPS/IFN γ -activated J774 macrophages.

Cells were pretreated with EUF (40, 20, 10, 5 μ g/mL) for 4 h and then activated with LPS (1 ng/mL) + IFN γ (10 UI/mL). (A) PGE₂ was measured by EIA 24 h after LPS/IFN γ activation in supernatants. Values are mean \pm sem ($n=3$). *: $p < 0.05$ vs LPS/IFN γ activation. The results are representative of three independent experiments. (B) COX-2 expression was determined by western-blotting 24 h after LPS/IFN γ activation. Signal intensities were evaluated by densitometric analysis (ImageJ software, NIH, USA) and normalized with β -actin. The data is a representative profile of three independent experiments.

Effect of EUF on TNF α , IL-6, and IL-10 production by LPS/IFN γ -activated J774 macrophages. Upon stimulation by LPS/IFN γ , macrophages also secrete several inflammatory cytokines including pro-inflammatory cytokines such as TNF α and IL-6 and anti-inflammatory cytokines such as IL-10. The cytokines were measured in culture supernatant by ELISA. Compared to unstimulated macrophages, activation by LPS/IFN γ dramatically increased the TNF α production at 6 h, and productions of IL-6 and IL-10 at 24 h (Figure 4A). Treatment with EUF induced a dose dependent inhibition of the TNF α production with a 38% inhibition at 40 μ g/mL. It also inhibited IL-6 production with a 61% inhibition (Figure 4B) and IL-10 production with a 87% inhibition at 40 μ g/mL (Figure 4C).

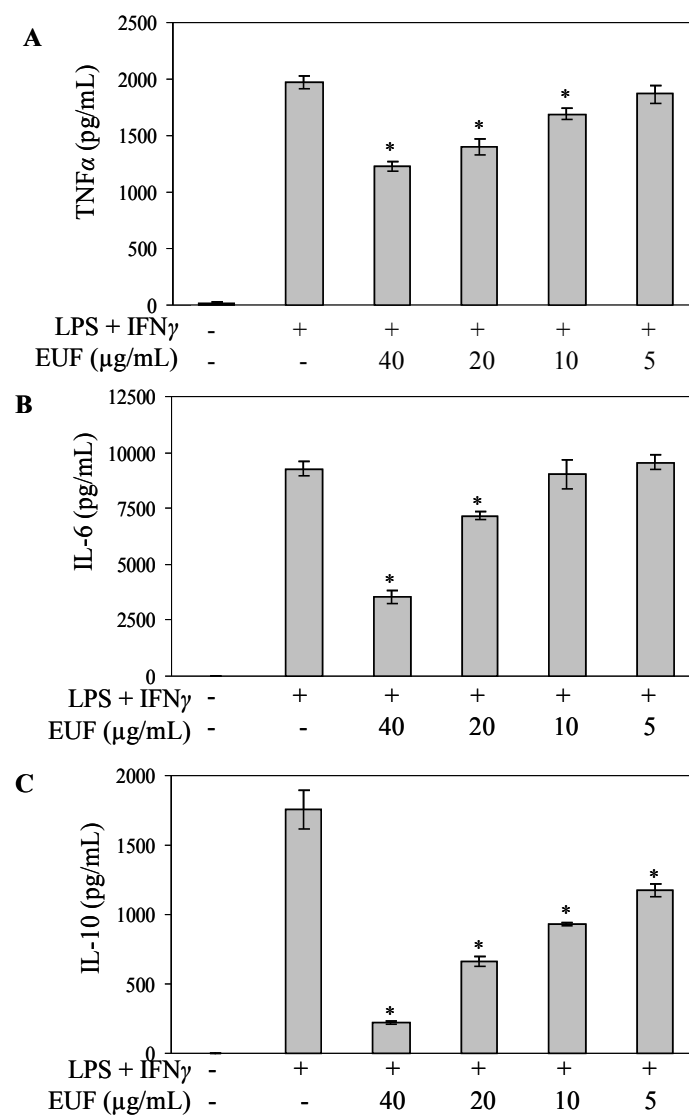


Figure 4: Effect of EUF on TNF α (A), IL-6 (B), and IL-10 (C) production by LPS/IFN γ -activated J774 macrophages.

Cells were pretreated with EUF (40, 20, 10, 5 μ g/mL) for 4 h and then activated with LPS (1 ng/mL) + IFN γ (10 UI/mL). Cytokines were measured in supernatants by ELISA 6 h (TNF α) and 24 h (IL-6, IL-10) after LPS/IFN γ activation. Values are mean \pm sem (n=3). *: $p < 0.05$ vs LPS/IFN γ activation. The results are representative of three independent experiments.

Effect of EUF on serum cytokine production and antioxidant capacity in LPS-induced endotoxic shock in mice. In our experimental model, LPS induced a strong and significant production of two pro-inflammatory cytokine, (TNF α and IL-6) and an anti-inflammatory cytokine (IL-10) in serum but with different kinetics depending on cytokine. TNF α production (Figure 5A) significantly increased at 1.5 h and subsequently decreased to reach the control values at 6 h. IL-6 production (Figure 5B) significantly and gradually increased from 1.5 h to 6 h as compared to control. IL-10 production significantly increased (Figure 5C) at 1.5 h to decreased

at 6 h. The pretreatment by EUF strongly decreased productions of $\text{TNF}\alpha$ at 1.5 h (46%) and IL-6 at 6 h (66%) induced by LPS in serum. IL-10 production was only decreased at 6 h (45%) after LPS injection. LPS-treated mice showed a significant increase in serum antioxidant capacity as compared to control at 1.5 h and subsequently a decrease at 6 h (Figure 5D). EUF inhibited significantly the antioxidant capacity induced by LPS, decreasing the value to the control level (16%) at 1.5 h and lowering it under the control level (15%) at 6 h.

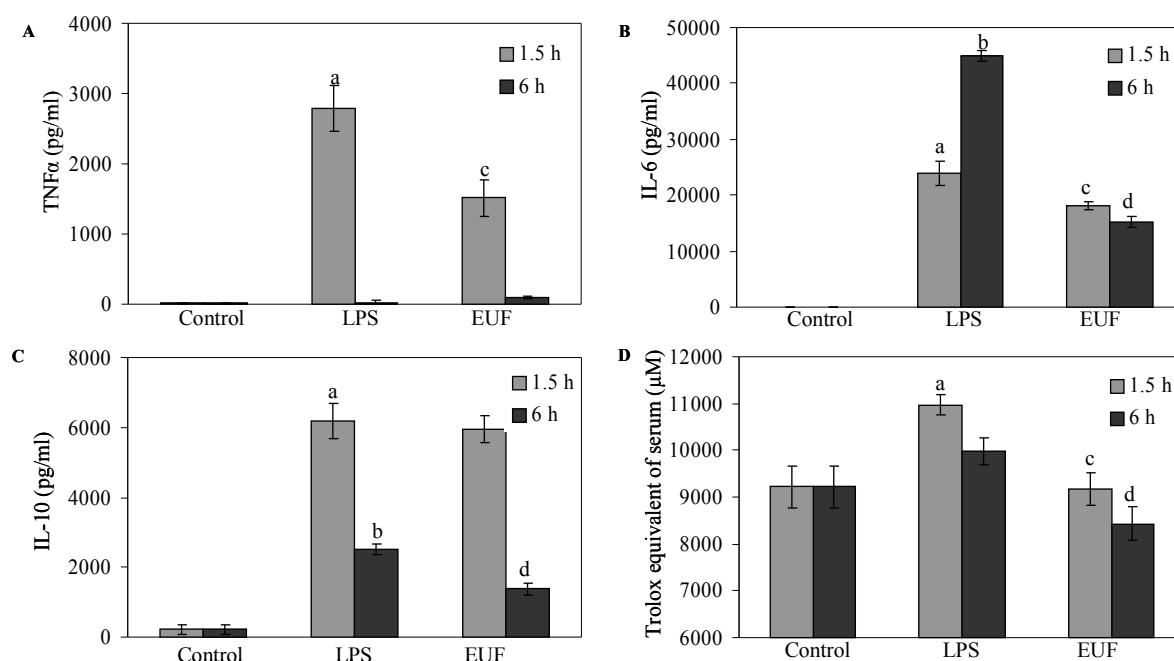


Figure 5: Effects of EUF on serum cytokine production and antioxidant capacity by LPS-induced endotoxic shock in mice.

Mice were pretreated with EUF (25 mg/Kg IP) 2 h before LPS injection (20 mg/Kg IP). $\text{TNF}\alpha$ (A), IL-6 (B), and IL-10 (C) were measured by ELISA in serum at 1.5 h and 6 h after LPS injection. Values are mean \pm sem ($n=8$); (D) antioxidant capacities of serum were measured by ORAC method at 1.5 h and 6 h after LPS injection. Values are expressed as μM Trolox equivalent and are mean \pm sem ($n=8$); a, b, c, and d: $p < 0.05$ vs Control 1.5 h, Control 6 h, LPS 1.5 h, and LPS 6 h respectively.

Effect of EUF on tissues cytokine production in LPS-induced endotoxic shock in mice.

Furthermore, we measured the cytokine productions in different tissues after LPS injection (Table 3). LPS-treated mice showed a strong increase in $\text{TNF}\alpha$ production at 1.5 h after LPS injection in spleen and in lung compared to control mice. EUF showed a strong significant inhibition principally in lung at 1.5 h (45%) and 6 h (65%) after LPS injection. IL-6 production was induced in all studied tissues at 1.5 h, and in kidney and lung at 6 h after LPS injection. The more pronounced inhibitory effects of EUF were observed in kidney (52%) and lung (41%) at 6 h. A

weak increase in IL-10 production was observed in spleen at 1.5 h and in lung at 6 h after LPS injection, and this increase was significantly potentiated by pretreatment of mice with EUF.

Table 3: Effect of EUF on cytokine production in different tissues in LPS-induced endotoxic shock in mice^a

Cytokines (pg/mg of proteins)		Control	LPS 1.5 h	EUF 1.5 h	LPS 6 h	EUF 6 h
TNF α	Spleen	15 \pm 15	255 \pm 6 b	221 \pm 30	19 \pm 4	nd c
	Liver	34 \pm 4	61 \pm 3 b	44 \pm 3 c	51 \pm 3 b	36 \pm 1 d
	Kidney	20 \pm 6	31 \pm 3	9 \pm 1 c	11 \pm 2	28 \pm 3 d
	Lung	37 \pm 5	111 \pm 9 b	61 \pm 6 c	65 \pm 6 b	23 \pm 6 d
IL-6	Spleen	nd	295 \pm 22 b	335 \pm 32	135 \pm 8 b	33 \pm 3 d
	Liver	44 \pm 4	119 \pm 4 b	102 \pm 14 c	87 \pm 3 b	84 \pm 3
	Kidney	nd	147 \pm 7 b	198 \pm 11 c	336 \pm 16 b	160 \pm 3 d
	Lung	10 \pm 2	207 \pm 12 b	260 \pm 16 c	442 \pm 20 b	260 \pm 10 d
IL-10	Spleen	117 \pm 4	159 \pm 9 b	206 \pm 16 c	121 \pm 4	107 \pm 3 d
	Liver	115 \pm 3	102 \pm 3 b	101 \pm 4	121 \pm 4	112 \pm 3
	Kidney	83 \pm 5	84 \pm 3	85 \pm 5	80 \pm 3	102 \pm 3 d
	Lung	130 \pm 3	126 \pm 5	153 \pm 4 c	166 \pm 4 b	209 \pm 3 d

a: Mice were pretreated with EUF (25 mg/Kg IP) 2 h before LPS injection (20 mg/Kg IP). TNF α , IL-6 and IL-10 were measured by ELISA in spleen, kidney, lung, and liver. Values are mean \pm sem (n=8); b, c, and d: $p < 0.05$ vs Control, LPS 1.5 h, and LPS 6 h respectively; nd: not detected.

DISCUSSION

A diet rich in fruit and vegetables that are a good source of carotenoids, phytosterols, tocopherols, and polyphenols is associated with the prevention of several diseases (11, 23). Carotenoids are natural pigments which possess antioxidant properties and prevent inflammatory diseases such as cardiovascular disease and rheumatoid arthritis (24, 25). Phytosterols have shown anti-inflammatory properties *in vivo* by decreasing oedema induced by carrageenan or TPA (26), and also by decreasing pro-inflammatory cytokines production (TNF α , IL-6) and increasing anti-inflammatory (IL-10) production in Apo E-KO Mice (27). Cycloartenol and 24-methylenecycloartanol have also shown anti-inflammatory properties in TPA induced inflammation in mice (28). Tocopherols which are considered as the most effective lipid soluble antioxidant also possess anti-inflammatory properties *in vivo* (29, 30).

Awara is a palm fruit traditionally consumed in French Guiana which contains a high carotenoid content (1) that make it a good candidate for bioactive extracts. We have previously described anti-inflammatory properties of awara pulp oil in endotoxic shock and pulmonary inflammation models (3). These effects should be due to the unsaponifiable matter of oil that is a

good source of antioxidant and anti-inflammatory compounds. We therefore decided to characterize EUF for carotenoid, phytosterol, and tocopherol contents. Carotenoids and phytosterols identified in EUF were similar to awara pulp oil composition (3) and represent respectively 125.7 and 152.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of EUF; α -tocopherol represents only 6.75 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of EUF. Carotenoids identified are cyclic and acyclic carotenes with β -carotene isomers as major compounds, and major phytosterol was β -sitosterol. Due to the presence of such nutritional components possessing antioxidant and/or anti-inflammatory properties and previously described properties of awara pulp oil, we chose to study anti-inflammatory properties of EUF.

First, we have tested the ability of EUF to inhibit COXs activities *in vitro*, enzymes represented by COX-1 which is constitutive and COX-2 which is induced during inflammation (14). EUF has shown a non-specific inhibition of COXs activity, which is a common mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drugs, and has shown a more potent inhibition for COX-2.

In inflammation diseases, macrophages play a central role; under activation they produce a large number of inflammatory mediators such as nitric oxide (NO), prostaglandins (PGE_2), pro-inflammatory ($\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β) and anti-inflammatory cytokines (IL-10) (12). $\text{TNF}\alpha$ plays a critical role in inflammation process and is produced in early stages by activated macrophages (31). IL-6 is known to be a multifunctional cytokine that regulates immune responses, hematopoiesis, acute phase response, and inflammation (32). IL-10 is an immunosuppressive and anti-inflammatory cytokine that modulates the function of several adaptive immune-related cells (33).

To assess the *in vitro* anti-inflammatory effect of EUF, we used murine J774 macrophage cell line activated by LPS/ $\text{IFN}\gamma$ association. EUF strongly inhibited nitrite production in activated macrophages, and this effect was due to inhibition of iNOS expression and NO scavenging capacity of EUF. Likewise, it strongly inhibited PGE_2 production in activated macrophages by inhibition of both activity and expression of COX-2 enzyme. These effects may be explained by anti-inflammatory properties of compounds identified in EUF. Indeed, β -sitosterol, main phytosterol found in fruit and vegetables, possesses anti-inflammatory properties *in vitro* by decreasing PGE_2 and PGI_2 production in P388D₁/MAB macrophages activated by LPS, but these effects are not due to alteration in COX-2 expression (34). However, β -sitosterol has shown to inhibit PGE_2 and NO production by inhibiting iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages stimulated by PMA (5). Experimental studies have shown that β -carotene has

anti-inflammatory properties in LPS-stimulated macrophages by inhibiting mediator production such as NO and PGE₂ via the inhibition of iNOS and COX-2 expression (35), and also inhibit PGE₂ production and COX-2 expression in colon cancer cells (36). Phytoene and phytofluene, carotenoid precursors, have also shown anti-inflammatory properties in human dermal fibroblasts treated with UV radiation (37). As shown in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages (38), and in Caco2 cells (39), tocopherols inhibit PGE₂ production and COX-2 activity but didn't affect COX-2 protein expression.

Then, we showed that EUF inhibited both pro-inflammatory (IL-6 and TNF α) and anti-inflammatory cytokine (IL-10) productions in LPS/IFN γ -activated J774 macrophages. β -carotene has showed anti-inflammatory properties in activated macrophages by inhibiting cytokine production (TNF α , IL-1 β) (35) and mRNA expression (IL-1 β and IL-6) (40). β -tocopherol also inhibited IL-1 β and TNF α production *in vitro* (41, 42).

Taken together, EUF inhibited a wide range of inflammatory mediators and cytokines that suggest a general inhibitory effect on macrophage activation. NF- κ B, a dimeric transcription factor, is a key molecule in the inflammatory pathway. It is a critical factor for expression of various inflammatory cytokines (TNF α , IL-6, -10) and expression of iNOS and COX-2 (43). NF- κ B activation has been already inhibited *in vitro* by β -sitosterol (5,44), cycloartenol (45), tocopherol (46) and β -carotene (35, 47). Thus, general inhibitory effect of EUF on macrophage activation may be explained by the inhibition of NF- κ B activation. EUF contains lower concentrations of micronutrients compared to active dose given in the literature of compounds tested alone, thus anti-inflammatory activities can be explained by a synergic action of identified molecules. These results showed for the first time the anti-inflammatory properties of an unsaponifiable extract from awara pulp oil *in vitro*.

To confirm *in vitro* anti-inflammatory properties of EUF, we thereafter used an *in vivo* model of endotoxic shock. Septic shock is a serious clinical problem with high mortality caused in most of cases by Gram-negative bacterial endotoxins such as LPS which is a potent activator of the immune system. Septic shock has been described to result from multitude of systemic and cellular processes and overproduction of inflammatory mediators such as TNF α , IL-6 and IL-10 leading to multiple organ failure (48). TNF α and IL-6 are implicated in the early phase of endotoxic shock (49). TNF α is one of the most important pro-inflammatory cytokines involved in endotoxic shock and IL-6 has both pro- and anti-inflammatory activities in acute inflammation (50).

In our experimental model, LPS induced a strong and significant production of TNF α , IL-6 and IL-10 in serum with different kinetics depending on cytokine. EUF pretreatment prevent the cytokine production induced by LPS in serum. Likewise, cytokine productions induced by LPS in tissues vary depending on timing and studied tissues. EUF decreased pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF α) principally in spleen and lung. Unexpectedly, EUF increased IL-10 production in spleen and lung after LPS injection. Previous studies have already shown that β -carotene treatment (35) or diet enriched with α -tocopherol and β -carotene (51) decrease inflammatory mediator production such as TNF α and IL-6 in endotoxic shock. Phytosterols also decreased pro-inflammatory cytokines production (TNF α , IL-6) and increased anti-inflammatory (IL-10) production in Apo E-KO Mice (27).

Septic shock is also associated with increased oxidative stress and decreased antioxidant defences (52). Thus, antioxidant supplementation is potentially useful in the management of septic shock (53). Therefore, we also measured the antioxidant capacity of serum after LPS-induced endotoxic shock. Unexpectedly, we showed a significant increase in antioxidant capacity at 1.5 h after LPS injection whereas EUF pretreatment prevent this increase. Similar results have been showed with awara pulp oil both in endotoxic shock and pulmonary inflammation model (3). EUF pretreatment decreased LPS-induced inflammation through inhibition of cell activation, thus we hypothesized that it may attenuate the antioxidant response induced by LPS.

To conclude, the endotoxic shock model has confirmed anti-inflammatory effects of EUF observed *in vitro* on activated macrophages. These effects on modulation of inflammatory mediator production may be due to identified compounds i.e. carotenoids, phytosterols and tocopherols. Thus, awara fruit consumption or uses of its unsaponifiable fraction may have a preventive role and/or a therapeutic potential in inflammation-related diseases.

LITERATURE CITED

- (1) Cavalcante, P. B. Edible Palm Fruits of the Brazilian Amazon. *Principes* **1977**, *21*, 91-103.
- (2) Kahn, F. The genus *Astrocaryum* (Arecaceae). *Rev. Peru. Biol.* **2008**, *15*, 031-048.
- (3) Bony, E.; Boudard, F.; Brat, P.; Dussossoy, E.; Portet, K.; Giaimis, J.; Michel, A. Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil: Chemical Characterization, and Anti-inflammatory Properties in a mice model of endotoxic shock and a rat model of pulmonary inflammation. *Submitted*.
- (4) Bester, D.; Esterhuyse, A. J.; Truter, E. J.; Van Rooyen, J. Cardiovascular effects of edible oils: a comparison between four popular edible oils. *Nutr. Res. Rev.* **2010**, 1-15.
- (5) Moreno, J. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *35*, 1073-1081.
- (6) Vivancos, M.; Moreno, J. Effect of resveratrol, tyrosol and β -sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E₂ synthesis by RAW 264.7 macrophages. *Br. J. Nutr.* **2008**, *99*, 1199-1207.
- (7) Sambanthamurthi, R.; Sundram, K.; Tan, Y. Chemistry and biochemistry of palm oil. *Prog. Lipid Res.* **2000**, *39*, 507-558.
- (8) Isomaki, P.; Punnonen, J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann. Med.* **1997**, *29*, 499-507.
- (9) Federico, A.; Morgillo, F.; Tuccillo, C.; Ciardiello, F.; Loguercio, C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 2381-2386.
- (10) Halayko, A. Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2003**, *137*, 209-222.
- (11) Calder, P. C.; Albers, R.; Antoine, J.; Blum, S.; Bourdet-Sicard, R.; Ferns, G. A.; Folkerts, G.; Friedmann, P. S.; Frost, G. S.; Guarner, F.; Løvik, M.; Macfarlane, S.; Meyer, P. D.; M'Rabet, L.; Serafini, M.; van Eden, W.; van Loo, J.; Vas Dias, W.; Vidry, S.; Winklhofer-Roob, B. M.; Zhao, J. Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. *Br. J. Nutr.* **2009**, *101*, 1-45.
- (12) Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 428-435.

-
- (13) Coleman, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **2001**, *1*, 1397-1406.
- (14) Simon, L. S. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am. J. Med.* **1999**, *106*, 37S-42S.
- (15) Seibert, K.; Zhang, Y.; Leahy, K.; Hauser, S.; Masferrer, J.; Perkins, W.; Lee, L.; Isakson, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 12013.
- (16) AFNOR NF ISO 9936 Détermination de la teneur en tocophérols et tocotriénols : Corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés; Corps gras d'origine animale et végétale; Paris, 1997; p. 1-10.
- (17) Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. *Carotenoids Handbook*; Birkhauser.; Basel, Switzerland, 2004.
- (18) De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5062-5072.
- (19) Mertz, C.; Brat, P.; Caris-Veyrat, C.; Gunata, Z. Characterization and thermal lability of carotenoids and vitamin C of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chem.* **2010**, *119*, 653-659.
- (20) Meng, X. L.; Yang, J. Y.; Chen, G. L.; Zhang, L. J.; Wang, L. H.; Li, J.; Wang, J. M.; Wu, C. F. RV09, a novel resveratrol analogue, inhibits NO and TNF- α production by LPS-activated microglia. *Int. Immunopharmacol.* **2008**, *8*, 1074-1082.
- (21) Boudard, F.; Vallot, N.; Cabaner, C.; Bastide, M. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods* **1994**, *174*, 259-268.
- (22) Dussossoy, E.; Brat, P.; Bony, E.; Boudard, F.; Poucheret, P.; Mertz, C.; Giaimis, J.; Michel, A. Characterization; anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *in press*, doi:10.1016/j.jep.2010.08.063.
- (23) Allen, S.; Britton, J. R.; Leonardi-Bee, J. A. Association between antioxidant vitamins and asthma outcome measures: systematic review and meta-analysis. *Thorax* **2009**, *64*, 610-619.
- (24) Krinsky, N.; Johnson, E. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Med.* **2005**, *26*, 459-516.

-
- (25) Smith, T. Carotenoids and cancer: prevention and potential therapy. *Br. J. Biomed. Sci.* **1998**, *55*, 268-75.
- (26) Navarro, A.; De Las Heras, B.; Villar, A. Anti-Inflammatory and Immunomodulating Properties of a Sterol Fraction from *Sideritis foetens* CLEM. *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24*, 470-473.
- (27) Nashed, B.; Yeganeh, B.; HayGlass, K. T.; Moghadasian, M. H. Antiatherogenic Effects of Dietary Plant Sterols Are Associated with Inhibition of Proinflammatory Cytokine Production in Apo E-KO Mice. *J. Nut.* **2005**, *135*, 2438-2444.
- (28) Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Oinuma, H.; Kasaharaya, Y.; Yamanouchi, S.; Takido, M.; Kumaki, K.; Tamura, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochem.* **1996**, *43*, 1255-1260.
- (29) Reiter, E.; Jiang, Q.; Christen, S. Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol. *Mol. Aspects Med.* **2007**, *28*, 668-691.
- (30) Singh, U.; Devaraj, S. Vitamin E: inflammation and atherosclerosis. *Vitam. Horm.* **2007**, *76*, 519-549.
- (31) Locksley, R. M.; Killeen, N.; Lenardo, M. J. The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* **2001**, *104*, 487-501.
- (32) Rose-John, S.; Waetzig, G. H.; Scheller, J.; Grötzinger, J.; Seegert, D. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11*, 613-624.
- (33) Mocellin, S.; Marincola, F.; Riccardo Rossi, C.; Nitti, D.; Lise, M. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2004**, *15*, 61-76.
- (34) Awad, A. Phytosterols decrease prostaglandin release in cultured P388D1/MAB macrophages. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2004**, *70*, 511-520.
- (35) Bai, S.; Lee, S.; Na, H.; Ha, K.; Han, J.; Lee, H.; Kwon, Y.; Chung, C.; Kim, Y. β -Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF- κ B activation. *Exp. Mol. Med.* **2005**, *37*, 323-334.
- (36) Palozza, P.; Serini, S.; Maggiano, N.; Tringali, G.; Navarra, P.; Ranelletti, F. O.; Calviello, G. β -Carotene Downregulates the Steady-State and Heregulin- α -Induced COX-2 Pathways in Colon Cancer Cells. *J. Nut.* **2005**, *135*, 129-136.

-
- (37) Fuller, B.; Smith, D.; Howerton, A.; Kern, D. Anti-inflammatory effects of CoQ10 and colorless carotenoids. *J. Cosmet. Dermatol.* **2006**, *5*, 30-8.
- (38) Jiang, Q.; Elson-Schwab, I.; Bedord, C.; Ames, B. γ -Tocopherol and its major metabolite, in contrast to α -tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 11494-11499.
- (39) O'leary, K.; De Pascual-Tereasa, S.; Needs, P.; Bao, Y.; O'Brien, N.; Williamson, G. Effect of flavonoids and Vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat. Res.* **2004**, *551*, 245-254.
- (40) Katsuura, S.; Imamura, T.; Bando, N.; Yamanishi, R. β -Carotene and β -cryptoxanthin but not lutein evoke redox and immune changes in RAW264 murine macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 1396-1405.
- (41) Devaraj, S.; Jialal, I. α -tocopherol decreases tumor necrosis factor- α mRNA and protein from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *38*, 1212-1220.
- (42) Devaraj, S.; Jialal, I. α -tocopherol decreases interleukin-1 β release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1999**, *19*, 1125-1133.
- (43) Brasier, A. The NF- κ B regulatory network. *Cardiovasc. Toxicol.* **2006**, *6*, 111-30.
- (44) Loizou, S.; Lekakis, I.; Chrousos, G. P.; Moutsatsou, P. β -sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 551-558.
- (45) Islam, M.; Yoshida, H.; Matsuki, N.; Ono, K.; Nagasaka, R.; Ushio, H.; Guo, Y.; Hiramatsu, T.; Hosoya, T.; Murata, T.; Hori, M.; Ozaki, H. Antioxidant, free radical-scavenging, and NF- κ B-inhibitory activities of phytosteryl ferulates: structure-activity studies. *J. Pharmacol. Sci.* **2009**, *111*, 328-337.
- (46) Rimbach, G.; Miniñane, A. M.; Majewicz, J.; Fischer, A.; Pallauf, J.; Virgli, F.; Weinberg, P. D. Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proc. Nutr. Soc.* **2002**, *61*, 415-425.
- (47) Imamura, T.; Bando, N.; Yamanishi, R. β -Carotene Modulates the Immunological Function of RAW264, a Murine Macrophage Cell Line, by Enhancing the Level of Intracellular Glutathione. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 2112-2120.

-
- (48) Annane, D.; Bellissant, E.; Cavaillon, J. M. Septic shock. *Lancet* **2005**, *365*, 63-78.
- (49) Tsiotou, A. G.; Sakorafas, G. H.; Anagnostopoulos, G.; Bramis, J. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med. Sci. Monit.* **2005**, *11*, RA76-85.
- (50) Gabay, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res. Ther.* **2006**, *8 Suppl 2*, S3.
- (51) Novoselova, E.; Lunin, S. M.; Novoselova, T. V.; Khrenov, M. O.; Glushkova, O. V.; Avkhacheva, N. V.; Safronova, V. G.; Fesenko, E. E. Naturally occurring antioxidant nutrients reduce inflammatory response in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *615*, 234-240.
- (52) Goode, H. F.; Cowley, H. C.; Walker, B. E.; Howdle, P. D.; Webster, N. R. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit. Care Med.* **1995**, *23*, 646-651.
- (53) Galley, H. F.; Howdle, P. D.; Walker, B. E.; Webster, N. R. The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *23*, 768-774.

II.5 Conclusion

Les premiers travaux réalisés ont mis en évidence les propriétés anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara *in vivo*. Nous avons émis l'hypothèse que ces effets étaient au moins en partie dus à la présence des microconstituants de l'insaponifiable que sont les caroténoïdes, les phytostérols et les tocophérols. Pour confirmer cette hypothèse nous avons donc évalué les propriétés anti-inflammatoires de cette fraction insaponifiable à la fois dans un modèle *in vitro* et *in vivo* ; fraction insaponifiable que nous avons dans un premier temps caractérisée chimiquement pour sa composition en microconstituants.

L'analyse des tocophérols a permis de quantifier l' α -tocophérol à 6,75 μg par mg de fraction insaponifiable, teneur similaire à l'extrait insaponifiable (5,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$). La fraction insaponifiable a montré un profil chromatographique similaire à l'extrait insaponifiable pour l'analyse des caroténoïdes, bien que la teneur totale en caroténoïdes (125,7 μg d'équivalent β -carotène par mg) soit inférieure à celle de l'extrait insaponifiable (233,9 μg d'équivalent β -carotène par mg). Cette différence importante est attribuée à la faible solubilité de la forme *all-trans* du β -carotène dans l'éthanol par rapport aux formes *cis*. Pour l'analyse des phytostérols, la fraction insaponifiable a également montré un profil chromatographique similaire à l'extrait insaponifiable. La teneur en phytostérols totaux (152,6 μg d'équivalent 5 α -cholestane-3 β -ol par mg) est légèrement inférieure à celle de l'extrait insaponifiable (174,7 μg d'équivalent 5 α -cholestane-3 β -ol par mg), la molécule d'arundoin, par son groupement éther, étant beaucoup plus lipophile que d'autres phytostérols.

Néanmoins, la fraction insaponifiable contient des teneurs non négligeables en caroténoïdes, phytostérols et tocophérols dont l'étude des activités biologiques *in vitro* et *in vivo* constitue la deuxième partie de ces travaux.

Nous avons évalué la capacité d'inhibition de la fraction insaponifiable sur l'activité des COX-1 et COX-2 *in vitro*. La fraction insaponifiable a montré une inhibition de l'activité des COX de façon dose dépendante avec une inhibition plus importante sur la COX-2. Suite à ces résultats préliminaires, nous avons évalué les effets de la fraction insaponifiable dans un modèle de macrophages murins activés. La fraction insaponifiable a montré une inhibition de la production de nitrites induite par le LPS/IFN γ et cette inhibition est en partie due à une inhibition de l'expression de l'iNOS, une activité de piégeage des nitrites étant également impliquée. La fraction insaponifiable inhibe également la production de PGE₂ et cet effet est en partie médié par l'inhibition de l'expression de la COX-2 ainsi que par l'inhibition de l'activité de cette enzyme. Ce

modèle *in vitro* a également permis de mettre en évidence une inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , d'IL-6) et anti-inflammatoires (IL-10). Ces premiers résultats suggèrent que la fraction insaponifiable inhibe de façon générale l'activation des macrophages induite par le LPS/IFN γ . Cette inhibition générale de l'activation cellulaire est potentiellement liée à l'inhibition du facteur de transcription NF- κ B qui est impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes dont l'iNOS et la COX-2 ainsi que dans la production d'IL-10, d'IL-6 et de TNF α . En effet, les constituants de la fraction insaponifiable (β -sitostérol, cycloarténol, tocophérol et β -carotène) ont déjà montré des effets inhibiteurs sur l'activation de ce facteur de transcription.

Afin de confirmer les effets observés *in vitro*, nous avons évalué l'effet de la fraction insaponifiable dans un modèle de choc endotoxique induit par le LPS *in vivo*. De la même manière que dans le modèle *in vitro*, le prétraitement par la fraction insaponifiable inhibe la production des cytokines pro- et anti-inflammatoires (TNF α , d'IL-6 et IL-10) induites par le LPS dans le sérum. Dans les différents organes étudiés, les effets sont variables en fonction des cytokines avec un effet inhibiteur général pour les cytokines pro-inflammatoires. De façon remarquable, la fraction insaponifiable augmente la production d'IL-10 dans certains tissus alors qu'elle l'inhibe dans le sérum et dans le modèle de macrophages activés.

Une augmentation de la capacité antioxydante du sérum est également observée en réponse à l'induction du choc endotoxique par l'injection de LPS et le traitement par la fraction insaponifiable diminue cette capacité antioxydante. L'inhibition générale de l'induction du choc endotoxique par la fraction insaponifiable semble responsable de la diminution de la réponse antioxydante de l'organisme suite à l'injection du LPS. Cet effet inhibiteur général de l'induction du choc endotoxique semble être médié par une inhibition de l'activation des cellules inflammatoires comme nous avons pu le montrer dans le modèle *in vitro* de macrophages activés.

Nous avons pu montrer précédemment, dans ce même modèle de choc endotoxique, que l'huile de pulpe entraînait une augmentation de la production d'IL-10 dans le sérum et certains organes. Cet effet contraire peut être du à la présence des constituants saponifiable de l'huile. L'acide oléique, acide gras majoritaire de l'huile, a montré des effets modulateurs sur la production de cytokines dans différentes études, cependant l'effet sur la production d'IL-10 varie en fonction des modèles utilisés (Verlengia *et al.*, 2003 ; Oh *et al.*, 2009 ; Cardoso *et al.*, 2010). De plus, des régimes alimentaires enrichis en différents types d'huiles, dont l'huile d'olive, n'ont pas montré d'effets bénéfiques sur la production d'IL-10 dans un modèle de choc endotoxique (Leite *et al.*,

2005). La différence de composition en microconstituants entre l'huile et la fraction insaponifiable peut également être responsable des effets inverses observés. La proportion de *all-trans-β*-carotène est en effet beaucoup plus importante dans l'huile que dans la fraction insaponifiable. De même, l'huile est plus riche en arundoin que la fraction insaponifiable, cette molécule n'a jamais été étudiée pour ses propriétés biologiques, il serait donc intéressant de l'isoler et d'explorer ses effets anti-inflammatoires. Cependant, les différences dans les traitements par l'huile (5 mL/Kg par VO, 24h et 2h avant le LPS) et par la fraction insaponifiable (25 mg/Kg par IP, 2h avant le LPS) rendent la comparaison des résultats difficile. L'évaluation de l'extrait insaponifiable total permettrait de déterminer le rôle exact des microconstituants de l'huile de pulpe d'awara dans ce modèle d'inflammation aiguë.

En conclusion, la fraction insaponifiable a montré un effet inhibiteur sur la production de médiateurs inflammatoires dans un modèle *in vitro*, résultant en partie de l'inhibition de l'activité des COXs ainsi que de l'inhibition de l'expression de la COX-2 et de l'iNOS. Ces effets anti-inflammatoires ont été confirmés dans un modèle *in vivo* et sont potentiellement attribuables à la présence des caroténoïdes, phytostérols et tocophérols identifiés dans la fraction insaponifiable, molécules ayant des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes.

Ces résultats nous permettent de confirmer l'implication des microconstituants de l'huile de pulpe d'awara dans ses effets anti-inflammatoires et suggèrent un rôle préventif et/ou thérapeutique de l'huile de pulpe d'awara et de sa fraction insaponifiable dans les pathologies associées à l'inflammation.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'awara est un fruit qui possède un potentiel important au niveau nutritionnel, mais également au niveau cosmétique et pharmaceutique. Son huile, très riche en caroténoïdes, est aujourd'hui commercialisée sur internet pour lutter contre le vieillissement de la peau grâce à ses propriétés anti-radicalaires et anti-inflammatoires. Cependant, il n'existe que très peu de données scientifiques décrivant ces propriétés. L'objectif de ce travail a donc été de caractériser chimiquement l'huile de pulpe d'awara et de mettre en évidence ses propriétés anti-inflammatoires dans différents modèles expérimentaux.

La caractérisation chimique de l'huile de pulpe nous a permis d'identifier comme acides gras principaux, les acides oléique (majoritaire) et palmitique, et de mettre en évidence une forte teneur en caroténoïdes. Nous avons pu identifier et quantifier pour la première fois les différents carotènes présents dans cette huile, le composé majoritaire étant le β -carotène. Différents phytostérols ont également été identifiés, principalement représentés par le β -sitostérol et l'arundoin, ce dernier n'a jamais été décrit dans l'huile de pulpe d'awara ou étudié pour ses propriétés biologiques. L'analyse des tocophérols a permis de détecter majoritairement l'isomère α -tocophérol.

L'identification de ces différentes classes de molécules connues pour leurs propriétés antioxydantes et/ou anti-inflammatoires nous a donc conduit à évaluer les effets anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara dans différents modèles animaux. L'évaluation des propriétés anti-inflammatoires dans un modèle de choc endotoxique chez la souris nous a permis de mettre en évidence un effet modulateur significatif de l'huile de pulpe d'awara sur la production de cytokines inflammatoires induites par l'injection de LPS. En effet, le traitement par l'huile de pulpe a entraîné une inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires ($\text{TNF}\alpha$, IL-6) et une augmentation de la production d'une cytokine anti-inflammatoire (IL-10). Nous avons ensuite cherché à confirmer ces effets dans un modèle d'inflammation chronique. Nous avons pu mettre en évidence dans un modèle d'inflammation bronchique induite par l'ovalbumine chez le rat, un effet inhibiteur de l'huile de pulpe d'awara sur l'afflux de cellules inflammatoires au niveau pulmonaire, principalement d'éosinophiles et de lymphocytes. Dans ces deux modèles, le traitement par l'huile de pulpe d'awara, par une inhibition globale des phénomènes inflammatoires induits, a permis de diminuer la réponse antioxydante de l'organisme. En effet, l'augmentation de la capacité antioxydante induite par le LPS, ou par la sensibilisation à l'ovalbumine, a été inhibée

par l'administration d'huile de pulpe d'awara dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire, le plasma et le sérum.

Ces travaux ont donc permis de mettre en évidence le rôle préventif de l'huile de pulpe d'awara dans deux modèles d'inflammation. Nous avons émis l'hypothèse que ces effets anti-inflammatoires étaient en partie dus à la présence des constituants mineurs de l'huile. En effet, les caroténoïdes, les phytostérols et les tocophérols sont décrits dans la littérature comme ayant des activités antioxydantes et/ou anti-inflammatoires que ce soit dans des modèles *in vitro* ou *in vivo*. La deuxième partie de ce travail a donc consisté en l'évaluation des effets anti-inflammatoires des constituants mineurs de l'huile afin d'expliquer en partie les effets observés de l'huile de pulpe d'awara.

Ces constituants mineurs sont retrouvés dans la fraction insaponifiable de l'huile de pulpe d'awara. Nous avons donc analysé la composition en caroténoïdes, phytostérols et tocophérols de cette fraction insaponifiable, puis évalué ses propriétés anti-inflammatoires dans deux modèles. La fraction insaponifiable a montré des effets modulateurs sur la production de différents médiateurs dans un modèle *in vitro* de macrophages activés. Nous avons pu mettre en évidence une inhibition de la production de médiateurs pro-inflammatoires (NO, PGE₂, TNF α , IL-6) et anti-inflammatoire (IL-10). Ce modèle *in vitro* nous a également permis de mettre en évidence un effet inhibiteur de la fraction insaponifiable sur l'expression des protéines iNOS et COX-2, enzymes responsables respectivement de la production de NO et de PGE₂. L'inhibition de ces différents médiateurs pro- et anti-inflammatoires ainsi que de l'expression des enzymes impliquées semble être engendré par une inhibition générale de l'activation des macrophages par la fraction insaponifiable.

Afin de confirmer les effets anti-inflammatoires observés *in vitro*, nous avons évalué l'effet modulateur de la fraction insaponifiable sur la production de cytokines dans un modèle *in vivo* de choc endotoxique. Nous avons pu mettre en évidence un effet inhibiteur de la fraction insaponifiable sur la production de TNF α , d'IL-6 et d'IL-10 dans le sérum et dans différents organes, bien qu'une augmentation de la production d'IL-10 ait néanmoins été observée dans certains organes. Le traitement par la fraction insaponifiable a également inhibé l'augmentation de la capacité antioxydante induite par le LPS dans le sérum, l'inhibition de la réponse inflammatoire diminuant la réponse antioxydante de l'organisme.

La deuxième partie de ce travail a donc permis de mettre en évidence les effets anti-inflammatoires de la fraction insaponifiable à la fois dans un modèle *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats nous permettent de confirmer l'implication des microconstituants de l'huile de pulpe d'awara dans ses effets antioxydants et anti-inflammatoires et suggèrent un rôle préventif et/ou thérapeutique de l'huile de pulpe d'awara et de sa fraction insaponifiable dans les pathologies associées à l'inflammation.

Les perspectives de ces travaux seraient d'explorer les différents mécanismes anti-inflammatoires impliqués, en particulier d'évaluer l'effet de l'huile ou de la fraction insaponifiable sur l'activation de NF- κ B qui est le facteur de transcription cible dans le traitement de l'inflammation. La modulation inversée de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 par l'huile et la fraction insaponifiable dans le modèle de choc endotoxique amène également des interrogations quant à l'action des différentes molécules présentes et plus particulièrement l'effet des acides gras dans ce modèle inflammatoire. Des expériences supplémentaires permettraient de comprendre les effets observés sur cette cytokine. Des études plus approfondies sur la composition chimique permettraient également d'identifier d'autres familles de molécules potentiellement impliquées dans les effets anti-inflammatoires observés. D'autre part, les effets biologiques de l'arundoin n'ont jamais été étudiés, il serait donc intéressant d'évaluer son rôle biologique et plus spécifiquement ses propriétés anti-inflammatoires puisque cette molécule se retrouve en grande quantité dans l'huile d'awara.

Les doses utilisées d'huile de pulpe dans nos modèles *in vivo* restent cependant élevées par rapport à une alimentation normale, un effet systémique d'un tel traitement est donc difficilement extrapolable à l'homme. L'utilisation thérapeutique de cette huile au niveau local semble néanmoins envisageable. En effet, l'évaluation des effets anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara dans des modèles d'inflammation intestinale ou digestive comme la maladie de Crohn semble être une perspective intéressante de nos travaux. Des effets anti-inflammatoires locaux peuvent également être explorés au niveau des muqueuses dans des modèles d'inflammations cutanées. Toutefois, la valorisation de l'huile de pulpe d'awara passe principalement par ses effets nutritionnels mais également cosmétiques. En effet, l'huile de pulpe d'awara, comme l'huile d'argan ou le beurre de karité, est intéressante au niveau cosmétique pour ses effets anti-vieillessement et anti-radicaux libres.

La fraction insaponifiable pourrait quant à elle être valorisée au niveau thérapeutique en tant que complément alimentaire ou traitement adjuvant dans certaines pathologies à composante inflammatoire. Toutefois, des études supplémentaires, expérimentales et cliniques sont nécessaires afin de confirmer nos résultats et d'évaluer le rapport bénéfice/risque d'un tel traitement complémentaire.

La mise en évidence des effets santé et plus particulièrement des effets anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara et de sa fraction insaponifiable permet à plus long terme d'envisager une culture et une production de ce palmier à plus grande échelle dans le but de valoriser les agroressources du bassin amazonien.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aderem, A., Ulevitch, R.J., 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.
- AFNOR, 1997. NF ISO 9936 Détermination de la teneur en tocophérols et tocotriénols : Corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés (No. 1), *Corps gras d'origine animale et végétale*. Paris.
- Aherne, S.A., O'Brien, N.M., 2008. Modulation of cytokine production by plant sterols in stimulated human Jurkat T cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 664-673.
- Ahumada, C., Sáenz, T., García, D., De La Puerta, R., Fernandez, A., Martinez, E., 1997. The effects of a triterpene fraction isolated from *Crataegus monogyna* Jacq. on different acute inflammation models in rats and mice. Leucocyte migration and phospholipase A2 inhibition. *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 329-331.
- Akihisa, T., Yasukawa, K., Yamaura, M., Ukiya, M., Kimura, Y., Shimizu, N., Arai, K., 2000. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2313-2319.
- Akihisa, T., Yasukawa, K., Oinuma, H., Kasaharay, Y., Yamanouchi, S., Takido, M., Kumaki, K., Tamura, T., 1996. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochem.* 43, 1255-1260.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J* 357, 593-615.
- Anderson, S.M., Krinsky, N., 1973. Protective action of carotenoid pigments against photodynamic damage to liposomes. *Photochem. Photobiol.* 18, 403-408.
- Andreadis, A., Hazen, S., Comhair, S., Erzurum, S.C., 2003. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 213-225.
- Arranz, S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., 2007. Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 425-431.
- Arrol, S., Mackness, M.I., Durrington, P.N., 2000. Vitamin E supplementation increases the resistance of both LDL and HDL to oxidation and increases cholesteryl ester transfer activity. *Atherosclerosis* 150, 129-134.
- Awad, A., 2004. Phytosterols decrease prostaglandin release in cultured P388D1/MAB macrophages. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70, 511-520.
- Awad, A., Fink, C., 2000. Phytosterols as Anticancer Dietary Components: Evidence and Mechanism of Action. *J. Nut.* 130, 2127-2130.
- Awad, A., Smith, A.J., Fink, C., 2001. Plant sterols regulate rat vascular smooth muscle cell growth and prostacyclin release in culture. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 64, 323-330.
- Bachoual, R., Boczkowski, J., 2005. Rôle des cytokines dans l'inflammation bronchopulmonaire. *EMC - Pneumologie* 2, 74-85.

- Bai, S., Lee, S., Na, H., Ha, K., Han, J., Lee, H., Kwon, Y., Chung, C., Kim, Y., 2005. β -Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF- κ B activation. *Exp. Mol. Med.* 37, 323-334.
- Balsano, C., Alisi, A., 2009. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. *Curr. Pharm. Des.* 15, 3063-3073.
- Bando, N., Yamamoto, M., Yamanishi, R., Terao, J., 2004. Synergistic effect of vitamin E and β -carotene on the suppression of ovalbumin-specific immunoglobulin E production in mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1031, 415-417.
- Bando, N., Yamanishi, R., Terao, J., 2003. Inhibition of immunoglobulin E production in allergic model mice by supplementation with vitamin E and β -carotene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 2176-2182.
- Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, Q., Bernard, P., 2002. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J. Ethnopharmacol.* 82, 155-158.
- Bayerl, C., 2008. β -carotene in dermatology: Does it help? *Acta Dermatovenereol Alp Panonica Adriat.* 17, 160-162, 164-166.
- Beckman, K., Ames, B., 1997. Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* 272, 19633-19636.
- Benayoun, L., Inserm, U., Pretolani, M., 2003. Le remodelage bronchique dans l'asthme: mécanismes et enjeux thérapeutiques. *M/S: médecine sciences* 19, 319-326.
- Benjelloun-Mlayah, B., Isaac, I., Chaik, A., Delmas, M., 2004. Extraits de fruits d'*Astrocaryum vulgare* et préparations obtenues à caractère anti-inflammatoire. FR2844202-A1.
- Bureau, D., 2001. Huiles et fractions insaponifiables de huit espèces de palmiers amazoniens Thèse de Sciences, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Bureau, D., Benjelloun-Mlayah, B., Banoub, J., Bravo, R., 2003. FA and Unsaponifiable Composition of Five Amazonian Palm Kernel Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80, 49-53.
- Bernard, P., Scior, T., Didier, B., Hibert, M., Berthon, J., 2001. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A2 inhibitors. *Phytochem.* 58, 865-874.
- Bester, D., Esterhuysen, A.J., Truter, E.J., Van Rooyen, J., 2010. Cardiovascular effects of edible oils: a comparison between four popular edible oils. *Nutr. Res. Rev.* 1-15.
- Beuther, D.A., 2009. Obesity and asthma. *Clin. Chest Med.* 30, 479-488.
- Bonnafoos, C., Viton, F., Maraval, G., 2006. Propriétés antioxydantes, anti-radicalaires et anti-raideurs rhumatismales des huiles et du tourteau d'*Astrocaryum vulgare*. FR2885296-A1
- Bora, P., Narain, N., R.V.M. Rocha, De Oliveira Monteiro, A., De Azevedo, R., 2001. Caracterización de las fracciones proteicas y lipidicas de pulpa y semillas de tucuma (*Astrocaryum vulgare* Mart.). *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 3, 111-116.

- Borel, P., Draï, J., Faure, H., Fayol, V., Galabert, C., Laromiguière, M., Le Moel, G., 2005. Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids. *Annales de biologie clinique* 63, 165-177.
- Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C., Bastide, M., 1994. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods* 174, 259-268.
- Bouic, P., Etsebeth, S., Liebenberg, R.W., Albrecht, C.F., Pegel, K., Van Jaarsveld, P.P., 1996. β -sitosterol and β -sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *Int. J. Immunopharmacol.* 18, 693-700.
- Bouic, P., Lamprecht, J.H., 1999. Plant Sterols and Sterolins: A Review of Their Immune-Modulating Properties. *Altern. Med. Rev.* 4, 170-177.
- Bousquet, J., Jeffery, P.K., Busse, W.W., Johnson, M., Vignola, A.M., 2000. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1720-1745.
- Brasier, A., 2006. The NF- κ B regulatory network. *Cardiovasc. Toxicol.* 6, 111-30.
- Brewer, J.M., Conacher, M., Hunter, C.A., Mohrs, M., Brombacher, F., Alexander, J., 1999. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J. Immunol.* 163, 6448-6454.
- Britton, G., 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9, 1551-1558.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., 2004. Carotenoids Handbook, Birkhauser. ed. Basel, Switzerland.
- Brufau, G., Canela, M., Rafecas, M., 2008. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutr. Res.* 28, 217-225.
- Butland, B.K., Strachan, D.P., Anderson, H.R., 1999. Fresh fruit intake and asthma symptoms in young British adults: confounding or effect modification by smoking? *Eur. Respir. J.* 13, 744-750.
- Cakmak, A., Zeyrek, D., Atas, A., Selek, S., Erel, O., 2009. Oxidative status and paraoxonase activity in children with asthma. *Clin. Invest. Med.* 32, 327-334.
- Cardoso, C.R., Favoreto, S., Oliveira, L.L., Vancim, J.O., Barban, G.B., Ferraz, D.B., Silva, J.S., 2010. Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: A new approach for skin repair. *Immunobiology*. DOI: 10.1016/j.imbio.2010.06.007.
- Cavalcante, P.B., 1977. Edible Palm Fruits of the Brazilian Amazon. *Principes* 21, 91-103.
- Centanni, S., Santus, P., Di Marco, F., Fumagalli, F., Zarini, S., Sala, A., 2001. The potential role of tocopherol in asthma and allergies: modification of the leukotriene pathway. *BioDrugs* 15, 81-86.
- Chaik, A., 2003. Activité anti-inflammatoire des composés insaponifiables d'*Astrocaryum vulgare*. Thèse de Sciences, Paul Sabatier, Toulouse.

- Chin, S., Hamid, N.A.A., Latiff, A.A., Zakaria, Z., Mazlan, M., Yusof, Y.A.M., Karim, A.A., Ibahim, J., Hamid, Z., Ngah, W.Z.W., 2008. Reduction of DNA damage in older healthy adults by Tri E Tocotrienol supplementation. *Nut.* 24, 1-10.
- Cho, Y.S., Moon, H., 2010. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Asthma. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2, 183-187.
- Coleman, J., 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* 1, 1397-1406.
- Colombo, M., 2010. An update on Vitamin E, Tocopherol and Tocotrienol - Perspectives. *Molecules* 15, 2103-2113.
- Comhair, S.A., Bhathena, P.R., Dweik, R.A., Kavuru, M., Erzurum, S.C., 2000. Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen-induced asthmatic response. *Lancet* 355, 624.
- Comhair, S.A., Bhathena, P.R., Farver, C., Thunnissen, F.B., Erzurum, S.C., 2001. Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. *FASEB J.* 15, 70-78.
- Comhair, S.A.A., Erzurum, S.C., 2010. Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal* 12, 93-124.
- Corrigan, C., 2008. Mechanisms of asthma. *Medicine* 36, 177-180.
- Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Hake, P., Salzman, A.L., Szabó, C., 1998. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 450-459.
- Das, U.N., 2006. Essential Fatty acids - a review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7, 467-482.
- De Bandt, M., Grossin, M., Driss, F., Pincemail, J., Babin-Chevaye, C., Pasquier, C., 2002. Vitamin E uncouples joint destruction and clinical inflammation in a transgenic mouse model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 522-532.
- De Granville, J., 1989. Les palmiers de la Guyane française. *Bois et Forêts des Tropiques* 43-54.
- De jong, A., Plat, J., Mensink, R., 2003. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *J. Nutr. Biochem.* 14, 362-369.
- De la Puerta, R., Martinez-Dominguez, E., Ruiz-Gutierrez, V., 2000. Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Z. Naturforsch. C.* 55, 814-9.
- De Raeve, H.R., Thunnissen, F.B., Kaneko, F.T., Guo, F.H., Lewis, M., Kavuru, M.S., Secic, M., Thomassen, M.J., Erzurum, S.C., 1997. Decreased Cu,Zn-SOD activity in asthmatic airway epithelium: correction by inhaled corticosteroid *in vivo*. *Am. J. Physiol.* 272, L148-154.
- De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., 2007. Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5062-5072.

- DeFranco, A.L., Robertson, M., Locksley, R.M., 2009. Immunité: La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires. De Boeck Université.
- Delattre, J., 2007. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques, 2 ed. Tec & doc. médicales internationales, Londres, Paris, New York.
- Desai, F., Ramanathan, M., Fink, C., Wilding, G.E., Weinstock-Guttman, B., Awad, A., 2009. Comparison of the immunomodulatory effects of the plant sterol β -sitosterol to simvastatin in peripheral blood cells from multiple sclerosis patients. *Int. Immunopharmacol.* 9, 153-157.
- Devaraj, S., Jialal, I., 1998. The effects of α -tocopherol on critical cells in atherogenesis. *Curr. Opin. Lipidol.* 9, 11-15.
- Devaraj, S., Jialal, I., 1999. α -tocopherol decreases interleukin-1 β release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1125-1133.
- Devaraj, S., Jialal, I., 2005. α -tocopherol decreases tumor necrosis factor- α mRNA and protein from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1212-1220.
- Di Rosa, M., Giroud, J.P., Willoughby, D.A., 1971. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* 104, 15-29.
- Dweik, R.A., Comhair, S.A., Gaston, B., Thunnissen, F.B., Farver, C., Thomassen, M.J., Kavuru, M., Hammel, J., Abu-Soud, H.M., Erzurum, S.C., 2001. NO chemical events in the human airway during the immediate and late antigen-induced asthmatic response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 2622-2627.
- El-Agamey, A., Lowe, G.M., McGarvey, D.J., Mortensen, A., Phillip, D.M., Truscott, T.G., Young, A.J., 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 430, 37-48.
- Eynott, P.R., Groneberg, D.A., Caramori, G., Adcock, I.M., Donnelly, L.E., Kharitonov, S., Barnes, P.J., Chung, K.F., 2002. Role of nitric oxide in allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Eur. J. Pharmacol.* 452, 123-133.
- Favier, A., 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* 108-115.
- Ferreira, E.D.S., Lucien, V.G., Amaral, A.S., Silveira, C.D.S., 2008. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de tucuma (*Astrocaryum vulgare* Mart.). *Alim. Nutr.* 19, 427-433.
- Ferreira, H.H., Bevilacqua, E., Gaglioti, S.M., De Luca, I.M., Zanardo, R.C., Teixeira, C.E., Sannomiya, P., Antunes, E., De Nucci, G., 1998. Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 358, 253-259.
- Floch, H., 1958. Les fruits à carotène Guyanais. *Plant Foods Hum. Nutr.* 3-4, 327-335.
- Gabay, O., Sanchez, C., Salvat, C., Chevy, F., Breton, M., Nourissat, G., Wolf, C., Jacques, C., Berenbaum, F., 2010. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthr. Cartil.* 18, 106-116.
- García, M.D., Sáenz, M.T., Gómez, M.A., Fernández, M.A., 1999. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. *Phytother. Res.* 13, 78-80.

- Gazel, M., 2002. *Astrocaryum vulgare* Martius, (Palma aouara, Aublet). URL: <http://kourou.cirad.fr/silvolab/implantations/campus/sentier/astricaryumvulgare.html>
- Gaziano, J.M., Hatta, A., Flynn, M., Johnson, E.J., Krinsky, N., Ridker, P.M., Hennekens, C.H., Frei, B., 1995. Supplementation with β -carotene *in vivo* and *in vitro* does not inhibit low density lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 112, 187-195.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K., 2010. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* 327, 656-661.
- Glauert, H.P., 2007. Vitamin E and NF- κ B activation: a review. *Vitam. Horm.* 76, 135-153.
- Govindan, N., Rajamohan, T., 2009. Wet and dry extraction of coconut oil: impact on lipid metabolic and antioxidant status in cholesterol coadministered rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 87, 610-616.
- Grenand, P., Moretti, C., Jacquemin, H., 1987. Pharmacopées traditionnelles en Guyane, ORSTOM. ed. Paris.
- Gülçin, I., Bursal, E., Sehitoglu, H.M., Bilsel, M., Gören, A.C., 2010. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2227-2238.
- Guo, F.H., Comhair, S.A., Zheng, S., Dweik, R.A., Eissa, N.T., Thomassen, M.J., Calhoun, W., Erzurum, S.C., 2000. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *J. Immunol.* 164, 5970-5980.
- Gupta, M.B., Nath, R., Srivastava, N., Shanker, K., Kishor, K., Bhargava, K.P., 1980. Anti-inflammatory and antipyretic activities of β -sitosterol. *Planta Med.* 39, 157-163.
- Gutendorf, B., 2001. Comparison of an array of *in vitro* assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicol.* 166, 79-89.
- Gylling, H.K., Hallikainen, M., Vidgren, H., Agren, J., Miettinen, T.A., 2006. Ester percentages of plant sterols and cholesterol in chylomicrons and VLDL of humans with low and high sterol absorption. *Atherosclerosis* 187, 150-152.
- Hamada, T., Egashira, N., Nishizono, S., Tomoyori, H., Nakagiri, H., Imaizumi, K., Ikeda, I., 2007. Lymphatic absorption and deposition of various plant sterols in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, a strain having a mutation in ATP binding cassette transporter G5. *Lipids* 42, 241-248.
- Heliövaara, M., Knekt, P., Aho, K., Aaran, R.K., Alfthan, G., Aromaa, A., 1994. Serum antioxidants and risk of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 53, 51-53.
- Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K., Yodoi, J., 1999. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 274, 27891-27897.
- Hylkema, M.N., Hoekstra, M.O., Luinge, M., Timens, W., 2002. The strength of the OVA-induced airway inflammation in rats is strain dependent. *Clin. Exp. Immunol.* 129, 390-396.

- Igel, M., Giesa, U., Lutjohann, D., von Bergmann, K., 2003. Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice. *J. Lipid Res.* 44, 533-538.
- Imamura, T., Bando, N., Yamanishi, R., 2006. β -Carotene Modulates the Immunological Function of RAW264, a Murine Macrophage Cell Line, by Enhancing the Level of Intracellular Glutathione. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 2112-2120.
- Janeway, C.A., Murphy, K., Walport, M., 2009. Immunobiologie. De Boeck.
- Jiang, Q., Ames, B., 2003. γ -tocopherol, but not α -tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *FASEB J* 17, 816-822.
- Jiang, Q., Elson-Schwab, I., Bedord, C., Ames, B., 2000. γ -Tocopherol and its major metabolite, in contrast to α -tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 11494-11499.
- Johnson, E., 2002. The role of carotenoids in human health. *Nutr. Clin. Care* 5, 56-65.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Bouharmont, J., Kellogg, E.A., Évrard, C., Stevens, P., 2001. Botanique systématique: une perspective phylogénétique. De Boeck Université.
- Kabe, Y., Ando, K., Hirao, S., Yoshida, M., Handa, H., 2005. Redox regulation of NF- κ B activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 395-403.
- Kahn, F., 2008. The genus *Astrocaryum* (Arecaceae). *Rev. Peru. Biol.* 15, 031-048.
- Kalayci, O., Besler, T., Kiliç, K., Sekerel, B.E., Saraçlar, Y., 2000. Serum levels of antioxidant vitamins (α -tocopherol, β -carotene, and ascorbic acid) in children with bronchial asthma. *Turk. J. Pediatr.* 42, 17-21.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.A., 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31, 671-701.
- Katsuura, S., Imamura, T., Bando, N., Yamanishi, R., 2009. β -Carotene and β -cryptoxanthin but not lutein evoke redox and immune changes in RAW264 murine macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 1396-1405.
- Khanapure, S.P., Garvey, D.S., Janero, D.R., Letts, L.G., 2007. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 311-340.
- Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., Schwarz, P.M., 2004. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 255-266.
- Klosterhalfen, B., Bhardwaj, R.S., 1998. Septic shock. *Gen. Pharmac.* 31, 25-32.
- Kojo, S., 2004. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 11, 1041-1064.
- Krinsky, N., 1998. Overview of lycopene, carotenoids, and disease prevention. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218, 95-97.
- Krinsky, N., Johnson, E., 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Med.* 26, 459-516.

- Kucharz, E., 2003. Application of avocado/soybean unsaponifiable mixtures (piascledine) in treatment of patients with osteoarthritis. *Ortop. Traumatol. Rehabil.* 5, 248-51.
- Landis, G.N., Tower, J., 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev.* 126, 365-379.
- Lee, C., Chang, J., Moon, D., Choi, Y.H., Choi, I., Park, Y., Kim, G., 2008. Lycopene suppresses ovalbumin-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 248-252.
- Lee, S., Lee, Y.S., Jung, S.H., Kang, S.S., Shin, K.H., 2003. Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*. *Arch. Pharm. Res.* 26, 719-722.
- Lee, Y.S., Shin, K.H., Kim, B.K., Lee, S., 2004. Anti-diabetic activities of fucosterol from *Pelvetia siliquosa*. *Arch. Pharm. Res.* 27, 1120-1122.
- Leite, M.S., Pacheco, P., Gomes, R.N., Guedes, A.T., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., Koatz, V.L.G., 2005. Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet. *Shock* 23, 173-178.
- Lercker, G., Rodriguez-Estrada, M., 2000. Chromatographic analysis of unsaponifiable compounds of olive oils and fat-containing foods. *J. Chrom. A* 881, 105-129.
- Liebler, D.C., Stratton, S.P., Kaysen, K.L., 1997. Antioxidant actions of β -carotene in liposomal and microsomal membranes: role of carotenoid-membrane incorporation and α -tocopherol. *Arch. Biochem. Biophys.* 338, 244-250.
- Lin, Y., Burri, B.J., Neidlinger, T.R., Müller, H.G., Dueker, S.R., Clifford, A.J., 1998. Estimating the concentration of β -carotene required for maximal protection of low-density lipoproteins in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 837-845.
- Ling, W., Jones, P., 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sciences* 57, 195-206.
- Lippiello, L., Nardo, J.V., Harlan, R., Chiou, T., 2008. Metabolic Effects of Avocado/Soy Unsaponifiables on Articular Chondrocytes. Evid. Based Complement. *Alternat. Med.* 5, 191-197.
- Liu, C., Wang, X.D., Bronson, R.T., Smith, D.E., Krinsky, N., Russell, R.M., 2000. Effects of physiological versus pharmacological β -carotene supplementation on cell proliferation and histopathological changes in the lungs of cigarette smoke-exposed ferrets. *Carcinogenesis* 21, 2245-2253.
- Liu, D., Shi, J., Colinaibarra, A., Kakuda, Y., Junxue, S., 2008. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and β -carotene mixtures on the DPPH free radical. *Food Sci. Technol.* 41, 1344-1349.
- Lizard, G., 2008. Phytosterols: to be or not to be toxic; that is the question. *Br. J. Nutr.* 100, 1150-1151.
- Loizou, S., Lekakis, I., Chrousos, G.P., Moutsatsou, P., 2010. β -sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 551-558.

- López-Bojórquez, L.N., Dehesa, A.Z., Reyes-Terán, G., 2004. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. *Arch. Med. Res.* 35, 465-479.
- Lubrano, C., Robin, J., Khaiat, A., 1994. Composition en acides gras, stérols et tocophérols d'huiles de pulpe de fruits de six espèces de palmiers de Guyane. *Oléagineux* 49, 59-65.
- Mabalirajan, U., Aich, J., Leishangthem, G.D., Sharma, S.K., Dinda, A.K., Ghosh, B., 2009. Effects of vitamin E on mitochondrial dysfunction and asthma features in an experimental allergic murine model. *J. Appl. Physiol.* 107, 1285-1292.
- Maiani, G., Castón, M.J.P., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I.G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D., Schlemmer, U., 2009. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 53 Suppl 2, S194-218.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D.B., Roitt, I., 2007. Immunologie, Nouv. éd. ed. Elsevier Masson, Issy-les-Moulineaux.
- Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., Beasley, R., 2004. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 59, 469-478.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32, 595-603.
- Mayne, S.T., 1996. β -carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J* 10, 690-701.
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435.
- Meng, X.L., Yang, J.Y., Chen, G.L., Zhang, L.J., Wang, L.H., Li, J., Wang, J.M., Wu, C.F., 2008. RV09, a novel resveratrol analogue, inhibits NO and TNF- α production by LPS-activated microglia. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1074-1082.
- Mertz, C., Brat, P., Caris-Veyrat, C., Gunata, Z., 2010. Characterization and thermal lability of carotenoids and vitamin C of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chem.* 119, 653-659.
- Meurs, H., Maarsingh, H., Zaagsma, J., 2003. Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 450-455.
- Meydani, M., Martin, A., Ribaya-Mercado, J.D., Gong, J., Blumberg, J.B., Russell, R.M., 1994. β -carotene supplementation increases antioxidant capacity of plasma in older women. *J. Nutr.* 124, 2397-2403.
- Miller, E.R., Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R.A., Appel, L.J., Guallar, E., 2005. Meta-Analysis: High-Dosage Vitamin E Supplementation May Increase All-Cause Mortality. *Annals of Internal Medicine* 142, 37-46.
- Moreno, J., 2003. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1073-1081.
- Mosser, D.M., 2003. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73, 209-212.

- Mosser, D.M., Zhang, X., 2008. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol. Rev.* 226, 205-218.
- Murakami, A., Nakashima, M., Koshiba, T., Maoka, T., Nishino, H., Yano, M., Sumida, T., Kim, O.K., Koshimizu, K., Ohigashi, H., 2000. Modifying effects of carotenoids on superoxide and nitric oxide generation from stimulated leukocytes. *Cancer Lett.* 149, 115-123.
- Nashed, B., Yeganeh, B., HayGlass, K.T., Moghadasian, M.H., 2005. Antiatherogenic Effects of Dietary Plant Sterols Are Associated with Inhibition of Proinflammatory Cytokine Production in Apo E-KO Mice. *J. Nut.* 135, 2438-2444.
- Navarro, A., De Las Heras, B., Villar, A., 2001. Anti-Inflammatory and Immunomodulating Properties of a Sterol Fraction from *Sideritis foetens* CLEM. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 470-473.
- Neves, P.C., Neves, M.C., Cruz, A.B., Sant'Ana, A.E., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1993. Differential effects of *Mandevilla velutina* compounds on paw oedema induced by phospholipase A2 and phospholipase C. *Eur. J. Pharmacol.* 243, 213-219.
- Niki, E., 2010. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 503-515.
- Nishida, S., Teramoto, K., Kimoto-Kinoshita, S., Tohda, Y., Nakajima, S., Tomura, T.T., Irimajiri, K., 2002. Change of Cu,Zn-superoxide dismutase activity of guinea pig lung in experimental asthma. *Free Radic. Res.* 36, 601-606.
- Ober, C., 2005. Perspectives on the past decade of asthma genetics. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 274-278.
- Oboh, F., 1995. Effect of refining variations and bleaching on the characteristics of tucum (*Astrocaryum vulgare* Mart) pulp oil. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 72, 77-82.
- Oboh, F., Oderinde, R., 1988. Analysis of Pulp and Pulp Oil of the Tucum (*Astrocaryum vulgare* Mart.) Fruit. *Food Chem.* 277-287.
- Oh, Y.T., Lee, J.Y., Lee, J., Kim, H., Yoon, K., Choe, W., Kang, I., 2009. Oleic acid reduces lipopolysaccharide-induced expression of iNOS and COX-2 in BV2 murine microglial cells: possible involvement of reactive oxygen species, p38 MAPK, and IKK/NF- κ B signaling pathways. *Neurosci. Lett.* 464, 93-97.
- Okamoto, N., Murata, T., Tamai, H., Tanaka, H., Nagai, H., 2006. Effects of α -tocopherol and probucol supplements on allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of allergic asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 141, 172-180.
- Omenn, G.S., Goodman, G.E., Thornquist, M.D., Balmes, J., Cullen, M.R., Glass, A., Keogh, J.P., Meyskens, F.L., Valanis, B., Williams, J.H., Barnhart, S., Hammar, S., 1996. Effects of a combination of β -carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 334, 1150-1155.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4619-4626.
- Paiva, S.A., Russell, R.M., 1999. β -carotene and other carotenoids as antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.* 18, 426-433.

- Palozza, P., 2005. Can β -carotene regulate cell growth by a redox mechanism? An answer from cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1740, 215-221.
- Palozza, P., Serini, S., Torsello, A., Boninsegna, A., Covacci, V., Maggiano, N., Ranelletti, F.O., Wolf, F.I., Calviello, G., 2002. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by β -carotene in undifferentiated and differentiated HL-60 leukemia cells: possible involvement of a redox mechanism. *Int. J. Cancer* 97, 593-600.
- Parratt, J.R., West, G.B., 1958. Inhibition by various substances of oedema formation in the hind-paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine, dextran, egg-white and compound 48/80. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 13, 65-70.
- Pauly, G., Moretti, C., 2000. Use of plant extracts with an anti-radical-type action and cosmetic or dermaopharmaceutical composition comprising such extracts. EP 1135103-B1
- Pauwels, R., Bazin, H., Platteau, B., van der Straeten, M., 1979. The influence of antigen dose on IgE production in different rat strains. *Immunol.* 36, 151-157.
- Perona, J.S., Martinez-Gonzalez, J., Sanchez-Dominguez, J.M., Badimon, L., Ruiz-Gutierrez, V., 2004. The Unsaponifiable Fraction of Virgin Olive Oil in Chylomicrons from Men Improves the Balance between Vasoprotective and Prothrombotic Factors Released by Endothelial Cells. *J. Nut.* 134, 3284-3289.
- Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Toivo, J.I., Swank, M.A., Simpkins, A.H., 2002. Free and Esterified Sterol Composition of Edible Oils and Fats. *J. Food Comp. Anal.* 15, 123-142.
- Piironen, V., Lindsay, D., Miettinen, T.A., Toivo, J.I., Lampi, A., 2000. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 80, 939-966.
- Plat, J., Mensink, R.P., 2001. Effects of diets enriched with two different plant stanol ester mixtures on plasma ubiquinol-10 and fat-soluble antioxidant concentrations. *Metab. Clin. Exp.* 50, 520-529.
- Poixblanc, C., 2001. Il a du piquant l'awaa. URL: http://www.terresdeguyane.fr/articles/CPO_0002/default.asp
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290-4302.
- Rahman, I., Bel, A., Mulier, B., Lawson, M.F., Harrison, D.J., Macnee, W., Smith, C.A., 1996. Transcriptional regulation of γ -glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 832-837.
- Rahman, I., Biswas, S.K., Kode, A., 2006. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 533, 222-239.
- Raicht, R.F., Cohen, B.I., Fazzini, E.P., Sarwal, A.N., Takahashi, M., 1980. Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Res.* 40, 403-405.
- Rangasamy, T., Guo, J., Mitzner, W.A., Roman, J., Singh, A., Fryer, A.D., Yamamoto, M., Kensler, T.W., Tuder, R.M., Georas, S.N., Biswal, S., 2005. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J. Exp. Med.* 202, 47-59.

- Rao, P., Knaus, E.E., 2008. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 11, 81s-110s.
- Reboul, E., Klein, A., Bietrix, F., Gleize, B., Malezet-Desmoulins, C., Schneider, M., Margotat, A., Lagrost, L., Collet, X., Borel, P., 2006. Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) Is Involved in Vitamin E Transport across the Enterocyte. *J. Biol. Chem.* 281, 4739-4745.
- Reynaert, N.L., Wouters, E.F.M., Janssen-Heininger, Y.M.W., 2007. Modulation of glutaredoxin-1 expression in a mouse model of allergic airway disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 36, 147-151.
- Riccioni, G., 2009. Carotenoids and cardiovascular disease. *Curr. Atheroscler. Rep.* 11, 434-439.
- Rigotti, A., 2007. Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Mol. Aspects Med.* 28, 423-436.
- Rimbach, G., Minihaue, A.M., Majewicz, J., Fischer, A., Pallauf, J., Virgli, F., Weinberg, P.D., 2002. Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proc. Nutr. Soc.* 61, 415-425.
- Romagnani, S., 2006. Regulation of the T cell response. *Clin. Exp. Allergy* 36, 1357-1366.
- Romanchik, J.E., Harrison, E.H., Morel, D.W., 1997. Addition of lutein, lycopene, or [beta]-carotene to LDL or serum in vitro: Effects on carotenoid distribution, LDL composition, and LDL oxidation. *J. Nutr. Biochem.* 8, 681-688.
- Roumestan, C., Michel, A., Bichon, F., Portet, K., Detoc, M., Henriquet, C., Jaffuel, D., Mathieu, M., 2007. Anti-inflammatory properties of desipramine and fluoxetine. *Respir. Res.* 8, 35.
- Rubbo, H., Radi, R., 2008. Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 1318-1324.
- Rufino, M.D.S.M., P?rez-Jim?nez, J., Arranz, S., Alves, R.E., de Brito, E.S., Oliveira, M.S., Saura-Calixto, F., 2010. Açai (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Para': a tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Res. Int.* in press, 10.1016/j.foodres.2010.09.011.
- Saleem, M., 2009. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Lett.* 285, 109-115.
- Salvemini, D., Wang, Z.Q., Bourdon, D.M., Stern, M.K., Currie, M.G., Manning, P.T., 1996. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. *Eur. J. Pharmacol.* 303, 217-220.
- Salvemini, D., Wang, Z.Q., Wyatt, P.S., Bourdon, D.M., Marino, M.H., Manning, P.T., Currie, M.G., 1996. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 118, 829-838.
- Sambanthamurthi, R., Sundram, K., Tan, Y., 2000. Chemistry and biochemistry of palm oil. *Prog. Lipid Res.* 39, 507-558.
- Saraiva, M., O'Garra, A., 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 170-181.
- Saremi, A., Arora, R., 2010. Vitamin E and Cardiovascular Disease. *Am. J. Ther.* 17, e56-e65.

- Sato, Y., Akiyama, H., Matsuoka, H., Sakata, K., Nakamura, R., Ishikawa, S., Inakuma, T., Totsuka, M., Sugita-Konishi, Y., Ebisawa, M., Teshima, R., 2010. Dietary carotenoids inhibit oral sensitization and the development of food allergy. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7180-7186.
- Sato, Y., Akiyama, H., Suganuma, H., Watanabe, T., Nagaoka, M.H., Inakuma, T., Goda, Y., Maitani, T., 2004. The feeding of β -carotene down-regulates serum IgE levels and inhibits the type I allergic response in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 978-984.
- Schroder, K., Sweet, M.J., Hume, D.A., 2006. Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiol.* 211, 511-524.
- Schuster, G.U., Kenyon, N.J., Stephensen, C.B., 2008. Vitamin A deficiency decreases and high dietary vitamin A increases disease severity in the mouse model of asthma. *J. Immunol.* 180, 1834-1842.
- Sen, C.K., Khanna, S., Rink, C., Roy, S., 2007. Tocotrienols: the emerging face of natural vitamin E. *Vitam. Horm.* 76, 203-261.
- Shimizu, T., 2009. Lipid Mediators in Health and Disease: Enzymes and Receptors as Therapeutic Targets for the Regulation of Immunity and Inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 123-150.
- Sierksma, A., Weststrate, J.A., Meijer, G., 1999. Spreads Enriched with Plant Sterols, Either Esterified 4,4-Dimethylsterols or Free 4-Desmethylsterols, and Plasma Total- and LDL-Cholesterol Concentrations. *Br. J. Nutr.* 82, 273-282.
- Singh, U., Devaraj, S., 2007. Vitamin E: inflammation and atherosclerosis. *Vitam. Horm.* 76, 519-549.
- Singh, U., Devaraj, S., Jialal, I., 2005. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 151-174.
- Smith, L.J., Houston, M., Anderson, J., 1993. Increased levels of glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147, 1461-1464.
- Smith-Kielland, I., Dornish, J.M., Malterud, K.E., Hvistendahl, G., Rømming, C., Bøckman, O.C., Kolsaker, P., Stenstrøm, Y., Nordal, A., 1996. Cytotoxic triterpenoids from the leaves of *Euphorbia pulcherrima*. *Planta Med.* 62, 322-325.
- Solomon, D.H., Schneeweiss, S., Glynn, R.J., Kiyota, Y., Levin, R., Mogun, H., Avorn, J., 2004. Relationship between selective cyclooxygenase-2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults. *Circulation* 109, 2068-2073.
- Soni, M.G., Thurmond, T.S., Miller, E.R., Spriggs, T., Bendich, A., Omaye, S.T., 2010. Safety of Vitamins and Minerals: Controversies and Perspective. *Toxicological Sciences* 118, 348-355.
- Sosnowska, J., Balslev, H., 2009. American palm ethnomedicine: A meta-analysis. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 5, 43.
- Strath, M., Warren, D.J., Sanderson, C.J., 1985. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J. Immunol. Methods* 83, 209-215.
- Strehlow, K., Rotter, S., Wassmann, S., Adam, O., Grohé, C., Laufs, K., Böhm, M., Nickenig, G., 2003. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ. Res.* 93, 170-177.

- Suchankova, J., Voprsalova, M., Kottova, M., Semecky, V., Visnovsky, P., 2006. Effects of oral α -tocopherol on lung response in rat model of allergic asthma. *Respirol.* 11, 414-421.
- Sugiura, H., Ichinose, M., 2008. Oxidative and nitrative stress in bronchial asthma. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 785-797.
- Suzuki, Y.J., Tsuchiya, M., Wassall, S.R., Choo, Y.M., Govil, G., Kagan, V.E., Packer, L., 1993. Structural and dynamic membrane properties of α -tocopherol and α -tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochem.* 32, 10692-10699.
- Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2004. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed. Pharmacother.* 58, 100-110.
- Tillie-Leblond, I., Iliescu, C., Deschildre, A., 2004. Physiopathologie de la réaction inflammatoire dans l'asthme. *Arch. Pédi.* 11, S58-S64.
- Traber, M.G., Atkinson, J., 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 4-15.
- Trautwein, E.A., Schulz, C., Rieckhoff, D., Kunath-Rau, A., Erbersdobler, H.F., Arjan de Groot, W., Meijer, G., 2002. Effect of Esterified 4-Desmethylsterols and -Stanols or 4,4'-Dimethylsterols on Cholesterol and Bile Acid Metabolism in Hamsters. *Br. J. Nutr.* 87, 227-237.
- Tripathi, P., 2007. Nitric oxide and immune response. *Indian J. Biochem. Biophys.* 44, 310-319.
- Tsiotou, A.G., Sakorafas, G.H., Anagnostopoulos, G., Bramis, J., 2005. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med. Sci. Monit.* 11, RA76-85.
- Urquiaga, I., Leighton, F., 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol. Res* 33, 55-64.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84.
- Van Arman, C.G., 1974. Anti-inflammatory drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* 16, 900-904.
- Van Poppel, G., 1996. Epidemiological evidence for β -carotene in prevention of cancer and cardiovascular disease. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50 Suppl 3, S57-61.
- Varshavskii, B.I., Trubnikov, G.V., Galaktimpva, L.P., Koreniak, N.A., Koledetnaia, I.L., Oberemok, A.N., 2003. Oxidant-antioxidant status of patients with bronchial asthma during inhalation and systemic glucocorticoid therapy. *Ter. Arkh.* 75, 21-24.
- Verlangieri, A.J., Bush, M.J., 1992. Effects of d- α -tocopherol supplementation on experimentally induced primate atherosclerosis. *J. Am. Coll. Nutr.* 11, 131-138.
- Verlengia, R., Gorjão, R., Kanunfre, C.C., Bordin, S., de Lima, T.M., Curi, R., 2003. Effect of arachidonic acid on proliferation, cytokines production and pleiotropic genes expression in Jurkat cells-a comparison with oleic acid. *Life Sci.* 73, 2939-2951.

- Villasenor, I.M., Angelada, J., Canlas, A.P., Echegoyen, D., 2002. Bioactivity studies on β -sitosterol and its glucoside. *Phytother. Res.* 16, 417-421.
- Vissers, M.N., Zock, P.L., Meijer, G.W., Katan, M.B., 2000. Effect of plant sterols from rice bran oil and triterpene alcohols from sheanut oil on serum lipoprotein concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 1510-1515.
- Vivancos, M., Moreno, J., 2005. β -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 91-97.
- Vivancos, M., Moreno, J., 2008. Effect of resveratrol, tyrosol and β -sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *Br. J. Nutr.* 99, 1199-1207.
- Vivekananthan, D.P., Penn, M.S., Sapp, S.K., Hsu, A., Topol, E.J., 2003. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 361, 2017-2023.
- Vonkeman, H.E., Van de Laar, M.A.F.J., 2010. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. *Semin. Arthritis Rheum.* 39, 294-312.
- Wagner, J.G., Jiang, Q., Harkema, J.R., Ames, B.N., Illek, B., Roubey, R.A., Peden, D.B., 2008. γ -tocopherol prevents airway eosinophilia and mucous cell hyperplasia in experimentally induced allergic rhinitis and asthma. *Clin. Exp. Allergy* 38, 501-511.
- Wang, X.D., Liu, C., Bronson, R.T., Smith, D., Krinsky, N., Russell, M., 1999. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given β -carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 60-66.
- Wiesch, D.G., Meyers, D.A., Bleecker, E.R., 1999. Genetics of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104, 895-901.
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 544-547.
- Wiser, J., Alexis, N.E., Jiang, Q., Wu, W., Robinette, C., Roubey, R., Peden, D.B., 2008. In vivo γ -tocopherol supplementation decreases systemic oxidative stress and cytokine responses of human monocytes in normal and asthmatic subjects. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 40-49.
- Wood, L.G., Gibson, P.G., 2010. Reduced circulating antioxidant defences are associated with airway hyper-responsiveness, poor control and severe disease pattern in asthma. *Br. J. Nutr.* 103, 735-741.
- Woyengo, T.A., Ramprasath, V.R., Jones, P.J.H., 2009. Anticancer effects of phytosterols. *Eur. J. Clin. Nutr.* 63, 813-820.
- Wu, D., Liu, L., Meydani, M., Meydani, S.N., 2005. Vitamin E increases production of vasodilator prostanoids in human aortic endothelial cells through opposing effects on cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. *J. Nutr.* 135, 1847-1853.
- Yamada, Y., Nakamura, H., Adachi, T., Sannohe, S., Oyamada, H., Kayaba, H., Yodoi, J., Chihara, J., 2003. Elevated serum levels of thioredoxin in patients with acute exacerbation of asthma. *Immunol. Lett.* 86, 199-205.

- Yamaoka, S., Kim, H., Ogihara, T., Oue, S., Takitani, K., Yoshida, Y., Tamai, H., 2008. Severe Vitamin E deficiency exacerbates acute hyperoxic lung injury associated with increased oxidative stress and inflammation. *Free Radic. Res.* 42, 602-612.
- Yasukawa, K., Akihisa, T., Kanno, H., Kaminaga, T., Izumida, M., Sakoh, T., Tamura, T., Takido, M., 1996. Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 573-576.
- Yeh, S., Wang, H., Chen, P., Wu, T., 2009. Interactions of β -carotene and flavonoids on the secretion of pro-inflammatory mediators in an *in vitro* system. *Chem. Biol. Interact.* 179, 386-393.
- Young, A.J., Lowe, G.M., 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 20-27.
- Young, J.M., Spires, D.A., Bedord, C.J., Wagner, B., Ballaron, S.J., De Young, L.M., 1984. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.* 82, 367-371.
- Yuk, J.E., Woo, J.S., Yun, C., Lee, J., Kim, J., Song, G., Yang, E.J., Hur, I.K., Kim, I.S., 2007. Effects of lactose- β -sitosterol and β -sitosterol on ovalbumin-induced lung inflammation in actively sensitized mice. *Int. Immunopharmacol.* 7, 1517-1527.
- Zingg, J., Azzi, A., 2004. Non-antioxidant activities of vitamin E. *Curr. Med. Chem.* 11, 1113-1133.

ANNEXES

Propriétés anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara (*Astrocaryum vulgare*, Arecaceae) dans un modèle de rat asthmatiforme

BONY E.¹, CALAS C., DUSSOSSOY E.¹, PALLET D.², BRAT P.², MICHEL A.¹

¹Laboratoire de pharmacologie et physiopathologie expérimentales, UMR Qualisud, Faculté de Pharmacie, Université Montpellier 1, France

²Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Département Performances des systèmes de production et de transformation tropicaux, UMR Qualisud, Montpellier, France



Botanique et phytochimie:

Famille des Arecaceae, palmier épineux très commun en Guyane française, fructification entre février et mars, drupe ovoïde rouge orangé à maturité. Huile de pulpe contenant stérols, tocophérols, alcools tri-terpéniques, hydrocarbures et caroténoïdes.

Pharmacopée traditionnelle de Guyane:

Utilisations Thérapeutiques:

amande: maux de dents, entorses, fonctions anti-rhumatismales et relaxantes, pulpe: xérophtalmie

Utilisations Nutritionnelles:

Bourgeon terminal (cœur de palmier), sève (Vin de palme), amande (beurre d'awara), pulpe (bouillon d'awara : plat traditionnel).

Objectifs du travail: étudier l'effet *in vivo* d'une huile de pulpe d'awara sur l'inflammation chronique dans un modèle de rat asthmatiforme

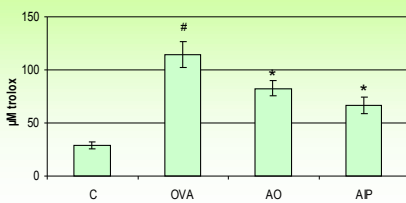
Mise en place du modèle chez le rat Brown Norway Protocole de 30 jours constitué de 4 lots de 8 animaux

- ♦ Sensibilisation à l'ovalbumine (agent allergisant) par injections intrapéritonéales (à J1, J2, J3 et J16) et par nébulisations (de J22 à J29)
- ♦ Traitement : 0,5ml l'huile de pulpe par voie orale ou par IP (de J22 à J29).
- ♦ Groupes: contrôle (C), sensibilisé (OVA), sensibilisé et traité par voie orale (AO), sensibilisé et traité par voie intrapéritonéale (AIP)

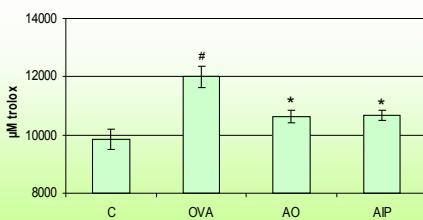
Évaluation de l'inflammation à J30

- ♦ Dénombrement cellulaire du BAL (lavage broncho-alvéolaire)
 - ♦ Capacité anti-oxydante du BAL et du plasma (méthode ORAC)
 - ♦ Dosage de l'activité éosinophile peroxydase du BAL
 - ♦ Dosage des protéines totales du BAL (méthode Bradford)
- Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem.
: $p < 0,05$, control vs ovalbumine, test de student
* : $p < 0,05$, lots traités vs ovalbumine, test de student

Capacité antioxydante du BAL



Capacité antioxydante du plasma

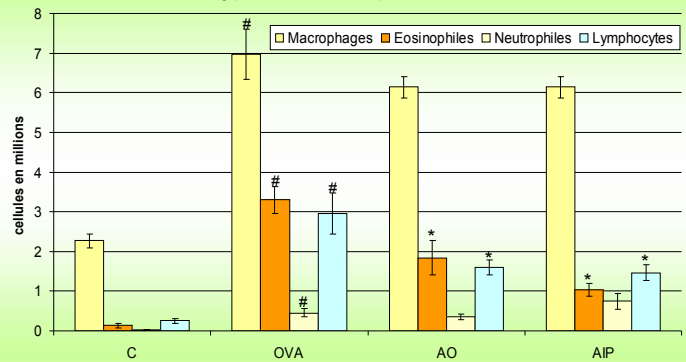


L'asthme { Désordre inflammatoire chronique + Hyperréactivité bronchique → gène respiratoire

Inflammation chronique caractérisée par :

- un infiltrat leucocytaire, principalement d'éosinophiles
- un stress oxydant
- des lésions cellulaires

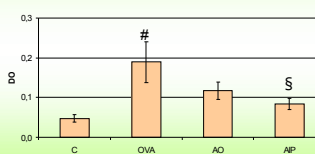
Différents types cellulaires présents dans le BAL



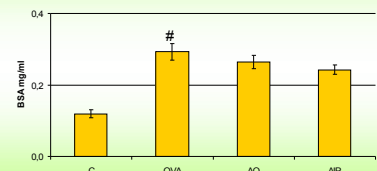
Sensibilisation à l'ovalbumine

Augmentation du nombre total de cellules dans le BAL avec une augmentation significative des éosinophiles et lymphocytes.
Augmentation significative de la capacité antioxydante du BAL et du plasma.
Augmentation significative de l'activité éosinophile peroxydase et du taux de protéines totales dans le BAL.
→ Création d'une inflammation bronchique caractérisée.

Activité éosinophile peroxydase du BAL



Protéines totales du BAL



§ : $p < 0,05$, OVA vs AIP, test de Mann-Whitney

Traitement par l'huile de pulpe d'awara :

- Diminution significative du nombre total de cellules ainsi que du nombre d'éosinophiles et de lymphocytes.
- Diminution significative de la capacité antioxydante du BAL et du plasma par rapport au lot sensibilisé.
- Diminution non significative du taux de protéines totales.
- Diminution significative de l'activité éosinophile peroxydase pour le lot traité par voie IP.

Le traitement par voie IP permet une meilleure biodisponibilité, et donc a un effet plus important que le traitement par voie orale.

Conclusion

L'ensemble des paramètres mesurés permet de mettre en évidence un effet anti-inflammatoire de l'huile de pulpe d'awara dans ce modèle asthmatiforme, avec un effet plus important du traitement par voie IP.

La présence, dans l'huile de pulpe d'awara, de molécules ayant des propriétés anti-oxydantes (tocophérols, caroténoïdes) et anti-inflammatoires (stérols, alcools triterpéniques) pourrait expliquer en partie ces effets.

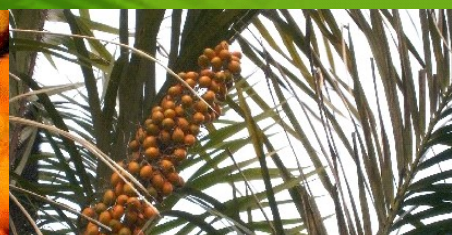
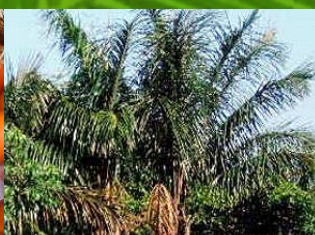
Activités immunomodulatrices d'un extrait insaponifiable d'huile de pulpe d'Awara (*Astrocaryum vulgare*, Arecaceae)

BONY E.¹, DUSSOSSOY E.¹, BOUDARD F.², GIAIMIS J.², PALLET D.³, BRAT P.³, MICHEL A.¹

¹Laboratoire de pharmacologie et physiopathologie expérimentales, UMR Qualisud, Faculté de Pharmacie, Université Montpellier 1, France

²Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Pharmacie, Université Montpellier 1, France

³Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Département Performances des systèmes de production et de transformation tropicaux, UMR Qualisud, Montpellier, France



Botanique:

Famille des Arecaceae, palmier épineux très commun en Guyane française, fructification entre février et mars, drupe ovoïde rouge orangé à maturité.

Composition de l'insaponifiable:

Stérols, tocophérols, alcools tri-terpéniques, hydrocarbures, caroténoïdes.

Pharmacopée traditionnelle de Guyane:

Utilisations Thérapeutiques:

Huile d'amande: maux de dents, entorses, fonctions anti-rhumatismales et relaxantes; pulpe: xérophtalmie.

Utilisations Nutritionnelles:

Bourgeon terminal (cœur de palmier), sève (Vin de palme), amande (beurre d'Awara), pulpe (bouillon d'Awara : plat traditionnel).

Objectifs du travail: rechercher les activités anti-inflammatoires *in vitro* d'un extrait insaponifiable d'huile de pulpe d'Awara sur des macrophages murins.

Matériels et Méthodes :

Lignée de macrophages murins J774 activés *in vitro* par l'association LPS/INF γ .

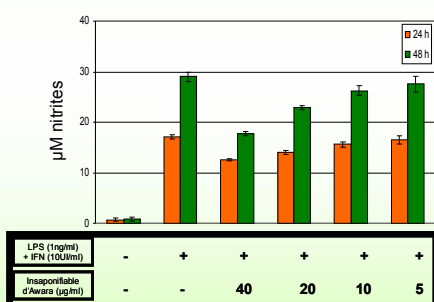
Dans ces conditions, les cellules sécrètent de l'oxyde nitrique (NO, molécule pro-inflammatoire), de l'interleukine 10 (IL-10, cytokine anti-inflammatoire) et des prostaglandines E₂ (PGE₂, molécule pro-inflammatoire).

Traitement par l'extrait 4 heures avant l'activation.

Le NO est dosé par méthode colorimétrique (réactif de Griess), l'IL-10 et les PGE₂ sont dosés par ELISA, dans les surnageants de culture de 24 ou 48h.

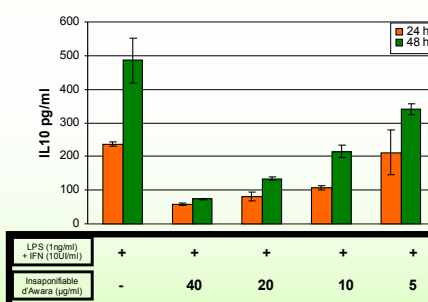
Résultats:

Effet sur la production de NO



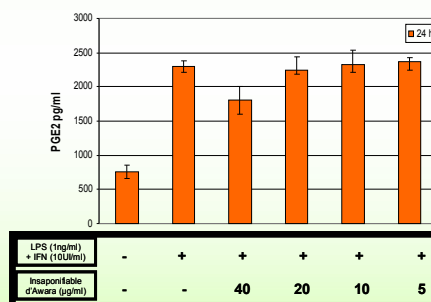
L'extrait insaponifiable d'Awara inhibe de façon dose-dépendante la production de monoxyde d'azote, cet effet étant plus important à 48h de culture.

Effet sur la production d'IL-10



L'extrait insaponifiable d'Awara montre une inhibition dose dépendante de la production d'IL-10, cet effet étant plus important à 48h.

Effet sur la production de PGE₂



Pour la concentration la plus élevée, on observe une diminution de la production de prostaglandines E₂ de 22%.

Conclusion

L'insaponifiable d'Awara entraîne une diminution dose-dépendante de la production de NO et d'IL-10. L'effet sur la production de PGE₂ semble plus faible.

La présence dans l'insaponifiable d'Awara de molécules ayant des propriétés anti-oxydantes (tocophérols, caroténoïdes) et anti-inflammatoires (stérols, alcools triterpéniques) pourrait expliquer en partie ces effets.

Perspectives

La mise en évidence de l'inhibition de la production d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1 et le TNF α pourrait confirmer un éventuel effet anti-inflammatoire de cet extrait insaponifiable *in vitro*.

Composition chimique et propriétés anti-inflammatoires de l'huile de pulpe d'awara (*Astrocaryum vulgare* M.)

L'awara (*Astrocaryum vulgare* M.) est le fruit d'un palmier utilisé principalement au niveau alimentaire pour sa pulpe riche en huile. L'objectif de ce travail a été de caractériser chimiquement l'huile de pulpe d'awara et d'évaluer ses propriétés anti-inflammatoires dans différents modèles expérimentaux. L'huile de pulpe, dont les acides gras principaux sont l'acide oléique et palmitique, a montré une forte teneur en caroténoïdes. Les microconstituants identifiés sont principalement représentés par le β -carotène (caroténoïdes), le β -sitostérol, l'arundoin (phytostérols) et l' α -tocophérol. L'huile de pulpe a montré des effets anti-inflammatoires dans un modèle *in vivo* de choc endotoxique par inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires (tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin (IL)-6) et augmentation de la production d'une cytokine anti-inflammatoire (IL-10). Ces effets anti-inflammatoires ont été confirmés dans un modèle *in vivo* d'inflammation bronchique. L'huile de pulpe a diminué l'afflux de cellules inflammatoires au niveau pulmonaire, principalement d'éosinophiles et de lymphocytes. La fraction insaponifiable a, par la suite, montré des effets inhibiteurs sur la production de différents médiateurs inflammatoires (oxyde nitrique, prostaglandine E₂, TNF α , IL-6, IL-10) ainsi que sur l'expression d'enzymes induites lors de l'inflammation (iNOS et COX-2) dans un modèle *in vitro* de macrophages activés. La fraction insaponifiable a également montré un effet inhibiteur sur la production de cytokines (TNF α , d'IL-6 et d'IL-10) dans le modèle *in vivo* de choc endotoxique. Ces résultats confirment l'implication des microconstituants de l'huile de pulpe d'awara dans ses effets antioxydants et anti-inflammatoires et suggèrent un rôle préventif et/ou thérapeutique de l'huile de pulpe d'awara et de sa fraction insaponifiable dans les pathologies associées à l'inflammation.

Mots clés: *Astrocaryum vulgare* M., huile de pulpe, fraction insaponifiable, caroténoïdes, phytostérols, tocophérols, activité anti-inflammatoire, activité antioxydante, modèle de choc endotoxique, modèle d'inflammation pulmonaire, macrophages J774.

Chemical composition and anti-inflammatory properties of awara pulp oil (*Astrocaryum vulgare* M.)

Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) is a palm fruit mainly used for nutritional purpose because of its oily pulp. The aim of this study was to characterize awara pulp oil and evaluate its anti-inflammatory properties in different experimental models. The pulp oil, whose major fatty acids are oleic and palmitic acid, showed a high content of carotenoids. The minor compounds identified are mainly represented by β -carotene (carotenoids), β -sitosterol, arundoin (phytosterols) and α -tocophérol. The pulp oil showed anti-inflammatory effects in an *in vivo* model of endotoxic shock by inhibiting the production of proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin (IL)-6) and increasing the production of an anti-inflammatory cytokine (IL-10). These anti-inflammatory effects have been confirmed in an *in vivo* model of airway inflammation. The pulp oil has reduced the influx of inflammatory cells in the lungs, mainly of eosinophils and lymphocytes. The unsaponifiable fraction has subsequently shown inhibitory effects on the production of various inflammatory mediators (nitric oxide, prostaglandin E₂, TNF α , IL-6, IL-10) and on the expression of enzymes induced during inflammation (iNOS and COX-2) in an *in vitro* model of activated macrophages. The unsaponifiable fraction also showed an inhibitory effect on cytokine production (TNF α , IL-6 and IL-10) in endotoxic shock model. These results confirm the role of microconstituents of awara pulp oil in its anti-inflammatory properties and suggest a preventive and/or therapeutic role of awara pulp oil and its unsaponifiable fraction in inflammation-related diseases.

Keywords: *Astrocaryum vulgare* M., awara pulp oil, unsaponifiable fraction, carotenoids, phytosterols, tocopherols, anti-inflammatory activity, antioxidant activity, endotoxic shock model, pulmonary inflammation model, J774 macrophages.

Emilie BONY

Discipline : Nutrition-Santé

Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Expérimentales, UMR Qualisud

Faculté de Pharmacie, Université Montpellier I